



Institut für Experimentelle Gentherapie  
und Tumorforschung



**UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK**

**Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung**

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer

# **Regulation des IGF-IR-Signalwegs durch miR-885**

**Inauguraldissertation**

**zur**

**Erlangung des akademischen Grades**

**Doktor der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Universität Rostock**



**vorgelegt von**

**Sophie Joost**

**geb. am 13.09.1988 in Göttingen**

**Rostock, den 06. Februar 2015**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. med. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Brigitte Pützer (Universitätsmedizin Rostock)
2. *Gutachter:* Priv. Doz. Dr. rer. nat. Thomas Bittorf (Universitätsmedizin Rostock)
3. *Gutachter:* Priv. Doz. Dr. rer. nat. Susanne Füssel (Universitätsklinikum Dresden)

**Tag der Verteidigung:** 07. Oktober 2015

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	V-VIII
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	IX-X

<b><u>1</u>    <u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1    Der Transkriptionsfaktor p73</b>	<b>1</b>
1.1.1    Tumorsuppressive Funktion von p73	1
1.1.2    Onkogene Wirkungsweise der DNp73-Isoformen	3
<b>1.2    Micro-RNAs in der Tumorforschung</b>	<b>4</b>
1.2.1    Biogenese und Funktion von micro-RNAs (miRs)	4
1.2.2    Rolle von p53 und mutp53 in der miR-Expression	6
<b>1.3    Der <i>insulin-like growth factor I receptor</i></b>	<b>7</b>
1.3.1    Der IGF-IR-vermittelte Signalweg	7
1.3.2    Funktion von IGF-IR in der Tumorprogression	9
<b>1.4    Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>11</b>
<b><u>2</u>    <u>Material und Methoden</u></b>	<b>12</b>
<b>2.1    Materialien</b>	<b>12</b>
2.1.1    Instrumente	12
2.1.2    Enzyme, Chemikalien und Puffer	14
2.1.3    Kits	14
2.1.4    Plasmide	15
2.1.5    Adenoviren	15
2.1.6    Lentiviren	15
2.1.7    Zelllinien	16

2.1.8	Antikörper	17
2.1.9	Oligonukleotide	18
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>18</b>
2.2.1	Zellkulturarbeiten und Funktionsanalysen	18
2.2.1.1	Kultivierung und Lagerung der Zellen	18
2.2.1.2	Zellzahlbestimmung und Aussaat	19
2.2.1.3	Zellernte	19
2.2.1.4	Transiente Zelltransfektion	20
2.2.1.5	Migrationsanalyse ( <i>scratch assay</i> )	20
2.2.1.6	Proliferationsanalyse ( <i>XTT assay</i> )	21
2.2.1.7	Matrigel-Invasionsanalyse ( <i>Boyden Chamber assay</i> )	21
2.2.1.8	Chemosensibilitätsanalyse	22
2.2.2	Adenovirale Arbeitstechniken	23
2.2.2.1	Titer verwendeter Viren	23
2.2.2.2	Transduktion	24
2.2.3	Lentivirale Arbeitstechniken	24
2.2.3.1	Herstellung lentiviraler Vektoren	24
2.2.3.2	Transduktion	25
2.2.4	RNA-Arbeitstechniken	26
2.2.4.1	RNA-Isolierung	26
2.2.4.2	Reverse Transkription für miR	26
2.2.4.3	Reverse Transkription für Gesamt-RNA	27
2.2.5	DNA-Arbeitstechniken	27
2.2.5.1	DNA-Restriktion	27
2.2.5.2	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	28
2.2.5.3	Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	28
2.2.5.4	Ligation	29
2.2.5.5	Transformation von stbl3 E.coli durch Elektroporation	29
2.2.5.6	Transformation von stbl3 E.coli durch Hitzeschock	30
2.2.5.7	Bakterien-Glycerin-Stocks	30

2.2.5.8	Mini-Plasmidpräparation	30
2.2.5.9	Maxi-Plasmidpräparation	31
2.2.5.10	DNA- & RNA-Konzentrationsbestimmung	31
2.2.5.11	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sqPCR)	32
2.2.5.12	Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktion oder PCR	33
2.2.5.13	Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR)	33
2.2.5.14	TaqMan® quantitative <i>real-time</i> PCR	34
2.2.6	Protein-Arbeitstechniken	34
2.2.6.1	Proteinextraktion aus Zelllysate	34
2.2.6.2	Bestimmung der Protein-Konzentration	35
2.2.6.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.6.4	Western Blot	37
2.2.6.5	Immunodetektion	38
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>39</b>
3.1	Regulation der miR-885-Expression durch p73 und seine N-terminal verkürzte-Isoform p73ΔEx2/3β	39
3.1.1	Der Tumorsuppressor p73 aktiviert die miR-885-Expression	39
3.1.2	Einfluss der onkogenen p73-Isoform DNp73 auf die p73-induzierte miR-885-Expression	42
3.2	<i>In vitro</i> -Analysen unter Chemotherapeutika-Einfluss	47
3.2.1	Endogener miR-885-Anstieg unter Zytostatika-Behandlung	47
3.2.2	Stabile miR-885-Überexpression führt zur Chemosensibilisierung <i>in vitro</i>	49
3.3	Einfluss der p73-miR-885-Kaskade auf die IGF-IR-Expression und den IGF-IR-Signalweg	52
3.3.1	Überexpression von miR-885 inhibiert die endogene IGF-IR-Expression	54
3.3.2	Überexpression von miR-885 inhibiert den IGF-IR-Signalweg	55

3.3.3	Einfluss von p73 versus DNp73 auf die IGF-IR-Expression und den IGF-IR-vermittelten Signalweg	56
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der Funktion von miR-885</b>	<b>57</b>
3.4.1	Unveränderte Zellproliferation nach miR-885-Überexpression	58
3.4.2	Reduzierte Zellmigration nach miR-885-Überexpression	59
3.4.3	Reduzierte Zellinvasion nach miR-885-Überexpression	61
<b><u>4</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>62</u></b>
4.1	Antagonistische Wirkung von p73 und DNp73 auf die miR-885-Expression	63
4.2	Repression der IGF-IR-Expression und des IGF-IR-Signalwegs durch miR-885	65
<b><u>5</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>70</u></b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b><u>71</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Thesen</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b><u>80</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>Erklärungen</u></b>	<b><u>82</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AB</b>	Antibiotika
<b>ABCA2-5</b>	<i>ATP-binding cassette subfamily A member 2-5</i>
<b>Ad.</b>	Adenovirus
<b>ad.</b>	Addiert
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AKT-Kinase</b>	Proteinkinase B
<b>AS-Primer</b>	<i>antisense primer</i>
<b>ASO</b>	<i>Antisense oligonucleotide</i>
<b>Bcl-2</b>	<i>B-cell lymphoma 2</i>
<b>BAD</b>	<i>Bcl-2-associated death promotor</i>
<b>bp</b>	Basenpaare
<b>C</b>	Carboxy-terminal
<b>c-Abl</b>	Tyrosinkinase ABL1
<b>cDDP</b>	Diammindichloridoplatin
<b>CDK2</b>	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary DNA/mRNA-komplementärer DNA-Strang</i>
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>c-kit</b>	<i>tyrosine-protein kinase Kit (CD117)</i>
<b>c-Raf</b>	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma Serin/Theronin-Proteinkinase</i>
<b>CTNNB</b>	β-Catenin
<b>DAPI</b>	4'6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DBD</b>	DNA-Bindungsdomäne
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	<i>desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure</i>
<b>DNp73</b>	dominant-negative p73-Isoform
<b>dNTP</b>	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>E-coli</b>	Escherichia coli
<b>et al.</b>	et ali
<b>ECL</b>	<i>enhanced chemoluminescence</i>

<b>EDTA</b>	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>
<b>EMT</b>	Epithelial-mesenchymale Transition
<b>EPLIN</b>	<i>epithelial protein lost in neoplasm</i>
<b>EPO</b>	Erythropetin
<b>ERK</b>	<i>extracellular-signal regulated kinase</i> (MAP-Kinase)
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell sorter</i> /Durchflusszytometer
<b>FCS</b>	<i>fetal calf serum</i> /fötales Kälberserum
<b>FGF</b>	<i>fibroblast growth factor</i>
<b>GFP</b>	grün-fluoreszierendes Protein
<b>GRB2</b>	Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein-2
<b>h</b>	Stunde
<b>HDAC</b>	Histon-Deacetylase
<b>HNSCC</b>	<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>
<b>HRP</b>	<i>horseradish peroxidase</i> /Meerrettich-Peroxidase
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IGF-IR</b>	<i>Insulin-like growth factor I receptor</i>
<b>IR</b>	Insulin-Rezeptor
<b>IGF-I/-II</b>	<i>Insulin growth factor I/-II</i>
<b>IGFBP</b>	IGF-Bindungsproteine
<b>IRS 1-4</b>	Insulin-Rezeptor-Substrate 1-4
<b>kB</b>	Kilobase
<b>kDA</b>	Kilo-Dalton
<b>kV</b>	Kilovolt
<b>L</b>	Liter
<b>LB-Medium</b>	<i>lysogeny broth</i> Nährmedium für Bakterienkultivierung
<b>MAP-Kinase</b>	<i>mitogen activated protein kinase</i>
<b>MCM5</b>	<i>DNA replication licensing factor</i>
<b>min</b>	Minute
<b>miR</b>	micro-RNA
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MOI</b>	<i>multiplicity of infection</i> /Infektionsmultiplizität
<b>MM</b>	<i>Master Mix</i>
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase



<b>mRNA</b>	<i>messenger RNA</i>
<b>mTOR</b>	<i>mammalian target of rapamycin</i>
<b>MW</b>	Mittelwert
<b>N</b>	Amino-terminal
<b>NEAs</b>	Nicht-essentielle Aminosäuren
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NSCLC</b>	<i>non-small cell lung cancer</i> /Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
<b>nt</b>	Nukleotid
<b>OD</b>	Oligomerisierungsdomäne sowie Optische Dichte
<b>OXR1</b>	<i>Oxidation Resistance Protein 1</i>
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i> /Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PCR</b>	<i>polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
<b>PDGF</b>	platelet-derived growth factor
<b>PDK-1</b>	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
<b>pfu</b>	<i>plaque forming units</i> /Plaques bildende Einheiten
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PI-3K</b>	Phosphatidylinositol-3-Kinase
<b>pH</b>	potentia hydrogenii
<b>p-</b>	phospho-
<b>qRT-PCR</b>	quantitative <i>real-time</i> PCR
<b>RARG</b>	<i>retinoic acid receptor gamma</i>
<b>RIPA-buffer</b>	Radioimmunoprecipitationspuffer
<b>RISC</b>	<i>RNA-induced Silencing complex</i>
<b>RNA</b>	<i>ribonucleic acid</i> /Ribonukleinsäure
<b>RNAi</b>	RNA-Interferenz
<b>RNAse</b>	Ribonuklease
<b>RNU6B</b>	<i>housekeeping gene</i> /Syn. RNA, U6 small nuclear 2
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription
<b>s</b>	Sekunde
<b>SAM</b>	<i>sterile alpha motif</i> -Domäne
<b>scr</b>	<i>scrambled</i> Lentivirus-Transduktionskontrolle
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat

<b>SFM</b>	Serumfreies Medium
<b>18S</b>	Ribosomales Protein 18S
<b>SHC</b>	<i>SH2 Containing protein</i>
<b>shRNA</b>	<i>short hairpin</i> RNA
<b>SOC-Medium</b>	SOB-Medium (Super Optimal Broth) Bakteriennährmedium + 20mM Glucose
<b>SOS</b>	<i>son of sevenless</i>
<b>sqPCR</b>	semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion
<b>STMN-1</b>	Stathmin 1/oncoprotein 18
<b>TA</b>	Transaktivierungsdomäne
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>TBS</b>	<i>tris-buffered saline</i>
<b>TCF4</b>	<i>Transcription Factor 4</i>
<b>TEMED</b>	Tetramethylethylendiamin
<b>Tm</b>	<i>melting temperature</i> /Schmelztemperatur
<b>TP53/TP73</b>	<i>tumor protein p53/tumor protein p73</i>
<b>U</b>	Unit (Enzymaktivität: 1 U= 1 mol x min <sup>-1</sup> )
<b>UpM</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UTR</b>	untranslatierte Region
<b>UV</b>	Ultraviolettes Licht
<b>V</b>	Volt
<b>VF</b>	Verdünnungsfaktor
<b>vs.</b>	versus
<b>w/v</b>	<i>weight per volume</i> /Gewicht pro Volumen
<b>w/o</b>	<i>without</i> /ohne
<b>XTT</b>	(2,3-Bis-2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-carboxanilid-Salz

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Proteinstruktur der <i>TP53</i> -Familienmitglieder. ....	1
Abb. 2: Genaufbau von p73 und Gegenüberstellung der p73-Isoformen TAp73 und DNp73. ....	2
Abb. 3: miR-Biogenese und post-transkriptionelles <i>Gensilencing</i> von mRNAs. ....	5
Abb. 4: Darstellung des IGF-IR-vermittelten Signalwegs. ....	8
Abb. 5: Induktion der miR-885-Expression in SK-Mel-29 nach p73-Überexpression. ....	40
Abb. 6: Induktion der miR-885-Expression nach p73-Überexpression in SK-Mel-147, A549 und H1299. ....	41
Abb. 7: Repression der miR-885-Expression nach p73- <i>Knock-down</i> in A549 und H1299. ....	42
Abb. 8: GFP-Nachweis 48 Stunden nach Ad.DNp73-Transduktion in H1299-Zellen. ....	43
Abb. 9: Repression der miR-885-Expression nach DNp73-Überexpression in SK-Mel-147, A549 und H1299. ....	43
Abb. 10: Induktion der miR-885-Expression nach ASO-116-vermitteltem DNp73- <i>Knock-down</i> in WM-793, SK-Mel-147 und A549. ....	45
Abb. 11: Repression der miR-885-Expression nach gleichzeitiger Überexpression von p73 und DNp73 in SK-Mel-29, A549 und H1299. ....	46
Abb. 12: Bestimmung der endogenen miR-885-Expression in SK-Mel-29, SK-Mel-147, SK-Mel-103, A549 und H1299. ....	47
Abb. 13: Induktion der miR-885-Expression unter Chemotherapeutika-Behandlung in A549 und H1299. ....	48
Abb. 14: Repression der miR-885-Expression nach p73- <i>Knock-down</i> in A549-Zellen unter cDDP und unter Doxorubicin. ....	49
Abb. 15: Veranschaulichung der Klonierung von miR-885. ....	50
Abb. 16: Etablierung stabil miR-885-exprimierender Zellen mittels lentiviralem Gentransfer. ....	50
Abb. 17: Erhöhte Chemosensibilität unter miR-885-Überexpression nach Cisplatin-Applikation. ....	51
Abb. 18: Erhöhte Chemosensibilität unter miR-885-Überexpression nach Doxorubicin-Applikation in A549- und H1299-Zellen. ....	52
Abb. 19: Tabellarische Darstellung der Auswahl von miR-885-spezifischen Target-Onkogenen mit zugehöriger Funktion und <i>Prediction Score</i> . ....	53
Abb. 20: Reduktion des Transkriptionsniveaus von IGF-IR, OXR1 und $\beta$ -Catenin in stabil miR-885-exprimierenden Lungenkrebszellen. ....	54
Abb. 21: Bestimmung des endogenen Proteinanteils von IGF-IR und $\beta$ -Aktin durch Western Blot-Analyse. ....	55
Abb. 22: Bestimmung der endogenen Proteinexpression der <i>Downstream</i> -Effektoren des IGF-IR-Signalwegs AKT und ERK sowie $\beta$ -Aktin (Kontrolle) in stabil miR-885-exprimierenden Lungenkrebszellen durch Western Blot. ....	56

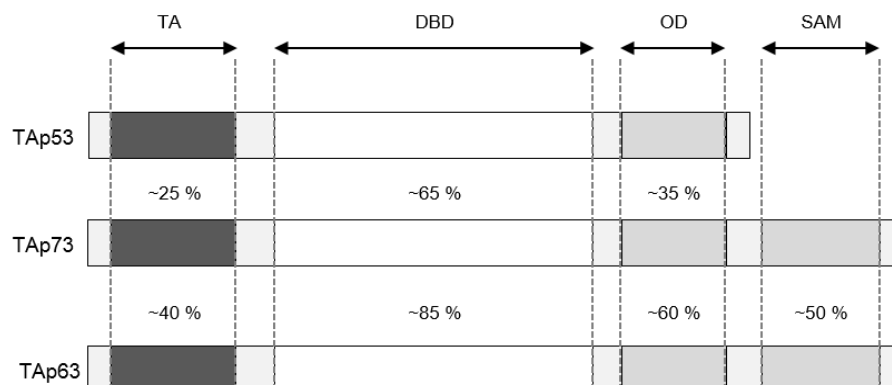
<b>Abb. 23: Bestimmung der endogenen Proteinexpression von IGF-IR und der IGF-IR-Signalwegseffektoren AKT &amp; ERK sowie <math>\beta</math>-Aktin nach p73-Transduktion in Lungenkrebszellen.....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 24: Etablierung einer stabilen <i>in vitro</i>-miR-885-Überexpression mittels lentiviraler Transduktion. ....</b>	<b>58</b>
<b>Abb. 25: Photometrische Absorptionsbestimmung von metabolisiertem XTT nach 0, 24, 48 und 72 Stunden.....</b>	<b>59</b>
<b>Abb. 26: Analyse der Zellmigration.....</b>	<b>60</b>
<b>Abb. 27: Analyse der Zellinvasion.....</b>	<b>61</b>
<b>Abb. 28: Modell der Regulation und Funktion von miR-885 <i>in vitro</i>.....</b>	<b>68</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Der Transkriptionsfaktor p73

### 1.1.1 Tumorsuppressive Funktion von p73

Das 1979 von mehreren Forschungsgruppen unabhängig voneinander entdeckte *TP53*-Gen (Lane et al., 1979; Linzer et al., 1979) spielt durch seine Funktion als Tumorsuppressor in der Krebsforschung eine große Rolle. Als „Wächter des Genoms“ nimmt p53 eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des Zellwachstums ein. Durch reaktive Induktion nach genotoxischen Schäden oder zellulärem Stress fördert p53 als Transkriptionsfaktor die Expression zahlreicher Gene, welche in Zellzyklusarrest und Apoptose involviert sind, sodass die Replikation geschädigter DNA und damit eine weitere Proliferation genetisch veränderter Zellen verhindert wird (Schlereth et al., 2010). Es ist daher nachvollziehbar, dass es in mehr als 50 % aller Tumoren durch Mutationen oder epigenetische Inaktivierung zum Verlust von p53 kommt (Davis PK et al., 2001).



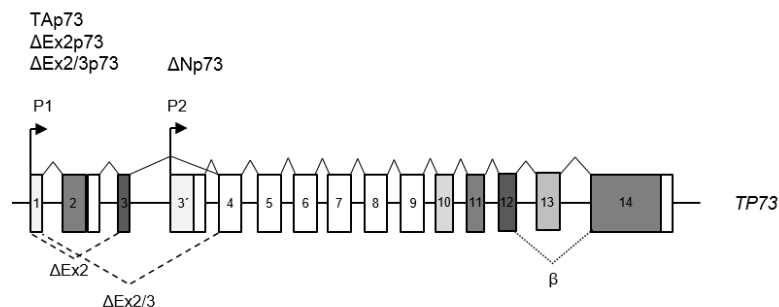
**Abb. 1: Schematische Proteinstruktur der *TP53*-Familienmitglieder.** Die Domänen von p53, p73 sowie p63 sind wie folgt dargestellt: N-terminale Transaktivierungsdomäne (TA), DNA-Bindungsdomäne (DBD) und Oligomerisierungsdomäne (OD). p73 und p63 weisen ein verlängertes C-Terminal für Protein-Protein-Interaktionen auf (SAM). Die Homologien innerhalb der Domänen zwischen den p53-Mitgliedern sind mit Prozentangaben angezeigt (Modifiziert nach Costanzo et al. 2014).

Zur p53-Familie werden heute neben p53 das 1997 identifizierte *TP73*-Gen und das wenig später entdeckte *TP63*-Gen gezählt (Kaghad et al., 1997). Als Mitglied der p53-Familie besitzt p73 einen ähnlichen Proteinaufbau wie p53 (Abb. 1). Am N-Terminus befindet sich die Transaktivationsdomäne (TA), gefolgt von der DNA-Bindungsdomäne

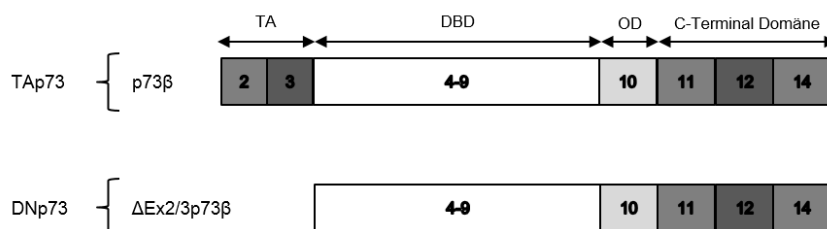
(DBD) und der C-terminalen Oligomerisierungsdomäne (OD) (Davis PK et al., 2001). Die größte Homologie zwischen den p53-Familienmitgliedern weist mit 63 % die DNA-Bindungsdomäne auf (Levrero et al., 2000).

Durch alternatives Spleißen am N- und C-Terminus sowie alternative Promotoren entstehen zahlreiche p73-Isoformen (Stiewe & Pützer, 2002; Murray-Zmijewski et al., 2006). Die N-terminalen p73-Isoformen lassen sich in zwei Gruppen einteilen (Abb. 2). Das TAp73-Volllängenprotein enthält die gesamte Aminosäuresequenz des *p73*-Gens und wird über den Promotor P1, welcher benachbart zum 1. Exon lokalisiert ist, generiert. Die zweite Gruppe umfasst die deltaN-p73-Proteine. Sie weisen im Gegensatz zu TAp73 einen verkürzten N-Terminus auf, da sie entweder durch die Generation über den weiter stromabwärts gelegenen P2 Promotor oder durch N-terminales Spleißen nach vorausgegangener Transkription von P1 entstehen (Murray-Zmijewski et al., 2006). Aufgrund der fehlenden TA-Domäne werden sie funktionell auch als dominant-negative DNp73-Isoformen bezeichnet. In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit der TAp73-Volllängenisoform p73 $\beta$  und der N-terminal verkürzten Isoform p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$ , die über P1 generiert wird, gearbeitet.

**A**



**B**



**Abb. 2: Genaufbau von p73 und Gegenüberstellung der p73-Isoformen TAp73 und DNp73. (A)** Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *TP73*-Gen-Locus. Die Transkriptionsstartpunkte der zwei Promotoren (TA- und  $\Delta$ N-Promotor) sind durch Pfeile dargestellt. Einige Spleißvarianten ausgehend von dem TA-Promotor P1 sind als  $\Delta$ Ex2 ( $\Delta$ Ex2p73) und  $\Delta$ Ex2/3 ( $\Delta$ Ex2/3p73) gekennzeichnet. Der P2 Promotor ist im 3. Intron (3') lokalisiert und Ausgangspunkt für die

Transkription von  $\Delta Np73$ . Die C-terminale Spleißvariante  $\beta$  ist gekennzeichnet. Die Exons sind durch Boxen dargestellt. **(B)** Darstellung für diese Arbeit wichtige TAp73 $\beta$ - und p73 $\Delta Ex2/3\beta$ -Isoformen. Transaktivierungs-kompetentes p73-Protein als TAp73 und N-terminal verkürztes Transaktivierungs-defizientes p73-Protein als DNp73 bezeichnet. Exonstruktur mit einzelnen Domänen in Graustufung sowie Nummerierung sind wie folgt gekennzeichnet: 1-3, Transaktivierungsdomäne; 4-9, DNA-Bindungsdomäne; 10, Oligomerisierungsdomäne; 11-14 verlängertes C-Terminus mit SAM (Modifiziert nach Murray-Zmijewski et al. 2006).

Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft zwischen p53 und p73 besitzt p73 ähnliche tumorsuppressive Funktionen. p73 fördert über verschiedene Mechanismen, wie beispielsweise durch die Transaktivierung pro-apoptotischer Gene Zellzyklusarrest und Apoptose (Lunghi et al., 2009; Candi et al., 2014). Darüber hinaus wird p73 durch Chemotherapie induziert (Lunghi et al., 2009). Hierbei kommt es durch die infolge der Zytostatika-Behandlung hervorgerufene Phosphorylierung und Acetylierung von p73 zu dessen Stabilisierung und Aktivierung (Gong et al., 1999; Mantovani et al., 2004). Der chemosensibilisierende Effekt von p73 ist dabei unabhängig vom p53-Status (Irwin et al., 2003).

### 1.1.2 Onkogene Wirkungsweise der DNp73-Isoformen

Im Gegensatz zur tumorsuppressiven Funktion von TAp73 weisen die deltaN-Proteine in vielerlei Hinsicht eine onkogene Funktion auf. Es ist bekannt, dass die N-terminal verkürzten p73-Isoformen gegenüber TAp73 eine antagonistische Wirkungsweise besitzen, weshalb sie auch als dominant-negative (sog. DNp73) Isoformen bezeichnet werden. Durch Ausbildung Transaktivierungs-defizienter Heteroduplex-Komplexe oder durch direkte Konkurrenz um p53-abhängige DNA-Bindungsstellen hemmt DNp73 die transkriptionelle Aktivität von TAp73. Infolge dessen kommt es zur Repression p73-abhängiger Zielgene, die bei Apoptoseprozessen oder Zellzyklusarrest eine wichtige Rolle spielen (Rufini et al., 2011; Candi et al., 2014). Bereits kurz nach ihrer Identifizierung haben Pozniak et al. anhand von *in vivo*-Versuchen die anti-apoptotische Funktion von deltaN-p73 nachgewiesen (Pozniak et al., 2000; Rufini et al., 2011). Im Rahmen der Tumorgenese und -progression haben ausgedehnte Analysen in verschiedenen Tumoren wie Neuroblastom, hepatozellulärem und cholangiozellulärem Karzinom, Magen- und Ovarialkarzinom (Stiewe & Pützer, 2002) ebenso sowie Melanom (Tuve et al., 2004) gezeigt, dass hohe TAp73-Expressionslevel mit hohen DNp73-Leveln einhergehen (Zaika et al., 2002; Tuve et al., 2004), wobei p73 in den seltensten Fällen Mutationen aufweist. Interessanterweise korreliert die Expression von DNp73 mit der Chemoresistenz aggressiver (invasiver/metastasierender) solider Tumoren (Zaika et al., 2002; Stiewe et al., 2002; Emmrich et al., 2009). Wir konnten zeigen, dass es durch

spezifischen *Knock-down* von DNp73 zur Erhöhung der Chemosensibilität bei malignen Melanomzellen kommt (Emmrich et al., 2009).

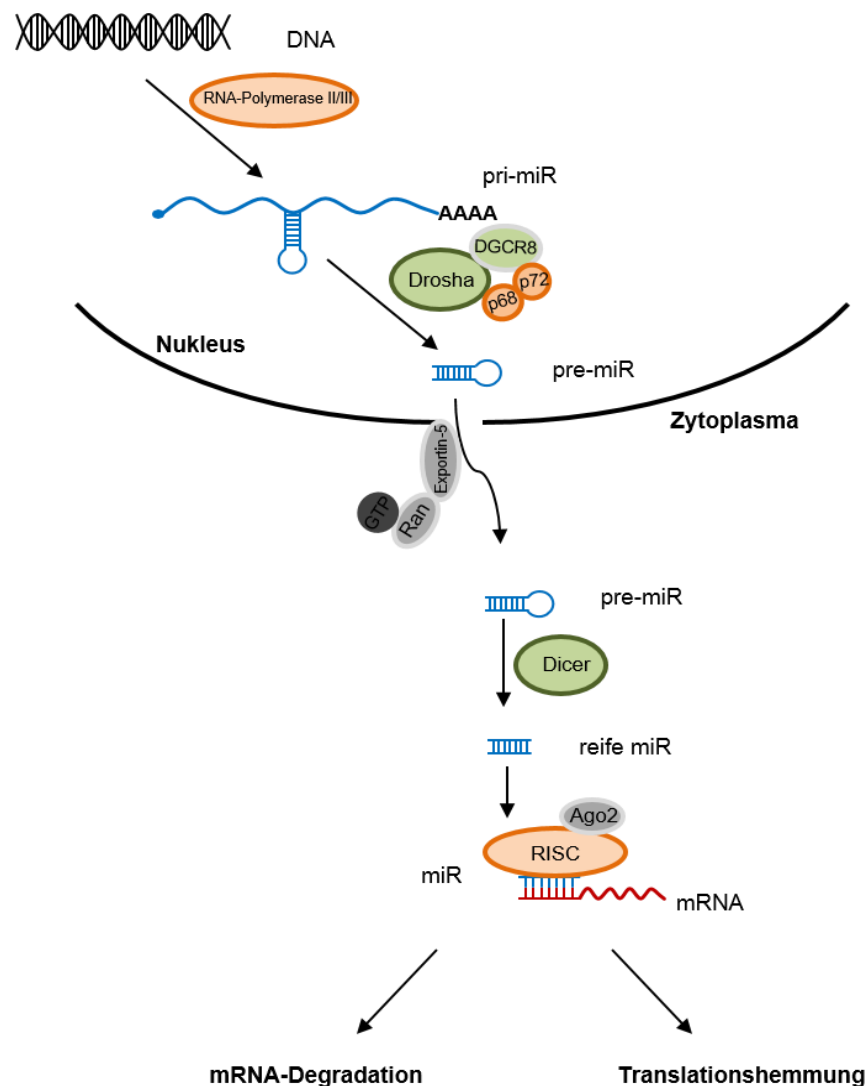
## 1.2 Micro-RNAs in der Tumorforschung

### 1.2.1 Biogenese und Funktion von micro-RNAs (miRs)

MiRs sind kleine endogene Moleküle, die aus 21-25 nicht-kodierenden Nukleotiden bestehen und durch post-transkriptionelles *Gensilencing* von *messenger-RNAs* (mRNA) eine wichtige Funktion in der Regulation der Genexpression einnehmen. Lange Zeit wurde vermutet, dass es sich bei den kurzen RNA-Transkripten wegen ihrer geringen Halbwertszeit um zelluläre Endprodukte handelt. Seit 1993 haben miRs mit der Identifizierung von miR lin-4 in der Forschung zunehmend an Bedeutung gewonnen (Wightman et al., 1993).

Die miR-Biogenese beginnt wie für jedes Gen im Nukleus mit der Transkription des jeweiligen miR-Gens durch die Polymerase-II oder -III (Abb. 3). Die transkribierte pri-miR weist eine Länge von 500 bis 3000 Nukleotiden (nt) auf und wird durch den Mikroprozessierungskomplex, bestehend aus der Ribonuklease Drosha, dem dsRNA-Bindeprotein DGCR8, den DEAD-Box RNA-Helikasen p68 (DDX5) und p72 (DDX17), zu einer 60-100 nt langen pre-miR mit charakteristischer Haarnadelstruktur prozessiert (Davis BN et al., 2009). Über Exportin-5 und Ran-GTP wird die Prekursor-miR ins Zytoplasma transportiert und im 3. Schritt von Dicer, einer weiteren Ribonuklease, auf eine Nukleotidlänge von 21 bis 25 nt verkürzt. Schließlich lagert sich die reife doppelsträngige miR, bestehend aus „guide“- und „passenger“-Strang, an den Multiprotein-Komplex *RNA-induced silencing-complex* (RISC) und bindet mit dem *guide*-Strang an komplementäre 3'UTR (untranslatierten Region)-Zielsequenzen der mRNA, während der *passenger*-Strang abgebaut wird (Davis BN et al., 2009). Die Interaktion zwischen miR und mRNA führt in Abhängigkeit von der Komplementarität sowie der Anwesenheit von verschiedenen RNA-Bindeproteinen der Argonaut-Familie (Ago2) entweder zur Translationshemmung oder direkten Degradation der mRNA (Kusenda et al., 2006; Bartel, 2009).





**Abb. 3: miR-Biogenese und post-transkriptionelles *Gensilencing* von mRNAs.** Schematische Darstellung der wichtigen Reifeschritte der miR-Synthese. Beginn mit der Transkription der pri-miR über Polymerase-II/III im Nukleus. Weitere Prozessierung zur pre-miR durch den Mikroprozessierungskomplex Drosha, DGCR8, p68 und p72. Transport ins Zytoplasma über Exportin-5/Ran-GTP. Verkürzung zur reifen miR über den Enzymkomplex Dicer. Anschließende Wechselwirkungen zwischen miR und komplementären 3'UTR-Sequenzen der mRNA sowie Anwesenheit von RISC und Bindungsproteinen der Argonaut-Familie (Ago2) führen zur mRNA-Degradation oder Translationshemmung (Modifiziert nach Lages et al. 2012).

Welche Auswirkungen hat das durch die miR-geförderte *Gensilencing*? Die Genexpression des betroffenen Gens wird gehemmt bzw. herunterreguliert und je nach Genfunktion, wie zum Beispiel im Zellzyklus, kann dies wachstumshemmende oder mitogene Effekte auf die Zellbiogenese haben. Vor diesem Hintergrund wird auch die seit der miR-Entdeckung bestehende Diskussion über ihre Funktion in der Tumorentwicklung verständlich. Ausgedehnte Studien haben einen globalen Abfall der miR-Expressionslevel in vielen verschiedenen Tumoren ergeben (Lu J et al., 2005).

Es ist bekannt, dass miRs durch gezieltes Eingreifen in die Expression von Onkogenen tumorsuppressive Funktionen besitzen. Dabei liegen zahlreiche *in vitro*-Ergebnisse von diversen miRs vor, die zeigen, dass miRs über die Repression von Zellzyklusregulatoren oder Onkogenen zu Wachstumsinhibition und gesteigertem G1/G2-Arrest sowie Zellalterung (*senescence*) führen (Bartel, 2009; Di Leva et al., 2014).

### 1.2.2 Rolle von p53 und mutp53 in der miR-Expression

Die Mitglieder der p53-Familie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der miR-Biogenese: Von p53 ist beispielsweise bekannt, dass es die Induktion von verschiedenen miRs über direkte Promotorbindung fördert (Chen PS et al., 2012; Jones et al., 2012) oder innerhalb des Reifeprozesses über die Interaktion mit Kofaktoren einen positiven Einfluss ausübt (Suzuki et al., 2009). Die miR-34-Familie gehört zu den zuerst identifizierten p53-regulierten miRs und wurde hinsichtlich der potentiell tumorsuppressiven Funktion von vielen Forschungsgruppen detailliert untersucht (Hermeking, 2007; Bommer et al., 2007; Raver-Shapira et al., 2007). Hierbei konnte gezeigt werden, dass p53 die Induktion der miR-34-Familie durch direkte Promotorbindung fördert und seinerseits im Sinne eines positiven *feedback-loops* von miR-34 induziert wird (Wong et al., 2011). Darüber hinaus wird in den Publikationen deutlich, dass miR-34 vor allem eine pro-apoptotische Funktion besitzt. Beispielsweise hat Hermeking neben Bommer und Kollegen gezeigt, dass die miR-34-Mitglieder durch Expressionshemmung der Onkogene c-Kit und Bcl-2 eine Erhöhung der Apoptose bzw. Chemosensibilisierung bewirken (Bommer et al., 2007; Hermeking, 2010; Siemens et al., 2013). Von weiteren p53-abhängigen miRs wie miR-192 und miR-215 konnten ebenfalls tumorsuppressive Effekte wie die Förderung von Zellzyklusarrest (durch Induktion von p21) sowie Verminderung der Zelladhäsion nachgewiesen werden (Braun et al., 2008).

Im Zusammenhang mit den onkogenen p53-Isoformen, die auch als *gain-of-function* Mutation bzw. mutp53 bezeichnet werden, ist die Expression von miRs ebenfalls untersucht worden. Zahlreiche Studien belegen, dass mutp53 durch Förderung der Invasion, Metastasierung und Chemoresistenz eine wichtige Rolle in der Tumorprogression einnimmt (Rivlin et al., 2011). Um den genauen Mechanismus zu erforschen und neue Signalwege aufzudecken, in denen insbesondere p53-regulierte miRs involviert sind, haben Dong et al. gezeigt, dass eine mutp53-geförderte Suppression von miR-130b die Reinduktion von diversen EMT-stimulierenden Proteinen bewirkt und dass so die Zellmotilität im Rahmen des Metastasierungsprozesses gefördert wird (Dong et al., 2013). Bezüglich des Chemoresistenz-fördernden Effekts

von mutp53 haben Masciarelli et al. erst kürzlich einen bisher unbekannten Signalweg gefunden, bei dem es über die direkte Repression von miR-223 durch mutp53 zum Anstieg der Expression vom Anti-Apoptose Faktor STMN-1 kommt, wodurch das Ansprechen auf Chemotherapeutika vermindert wird. (Masciarelli et al., 2014).

Über p73-abhängige miRs ist hingegen wenig bekannt. Unsere Forschungsgruppe hat bisher in humanen Melanomzelllinien gezeigt, dass die Expression von miR-205 spezifisch durch p73 induziert wird (Alla et al., 2012). Im Zusammenhang mit dem E2F1-DNp73-*getriggerten* Signalweg, der eine Erhöhung der Chemoresistenz zur Folge hat, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass miR-205 über *Gensilencing* von E2F1, Bcl-2 und der ATP-bindenden Transporter ABCA2 und ABCA5 die durch Zytostatika-ausgelöste Apoptose erhöht.

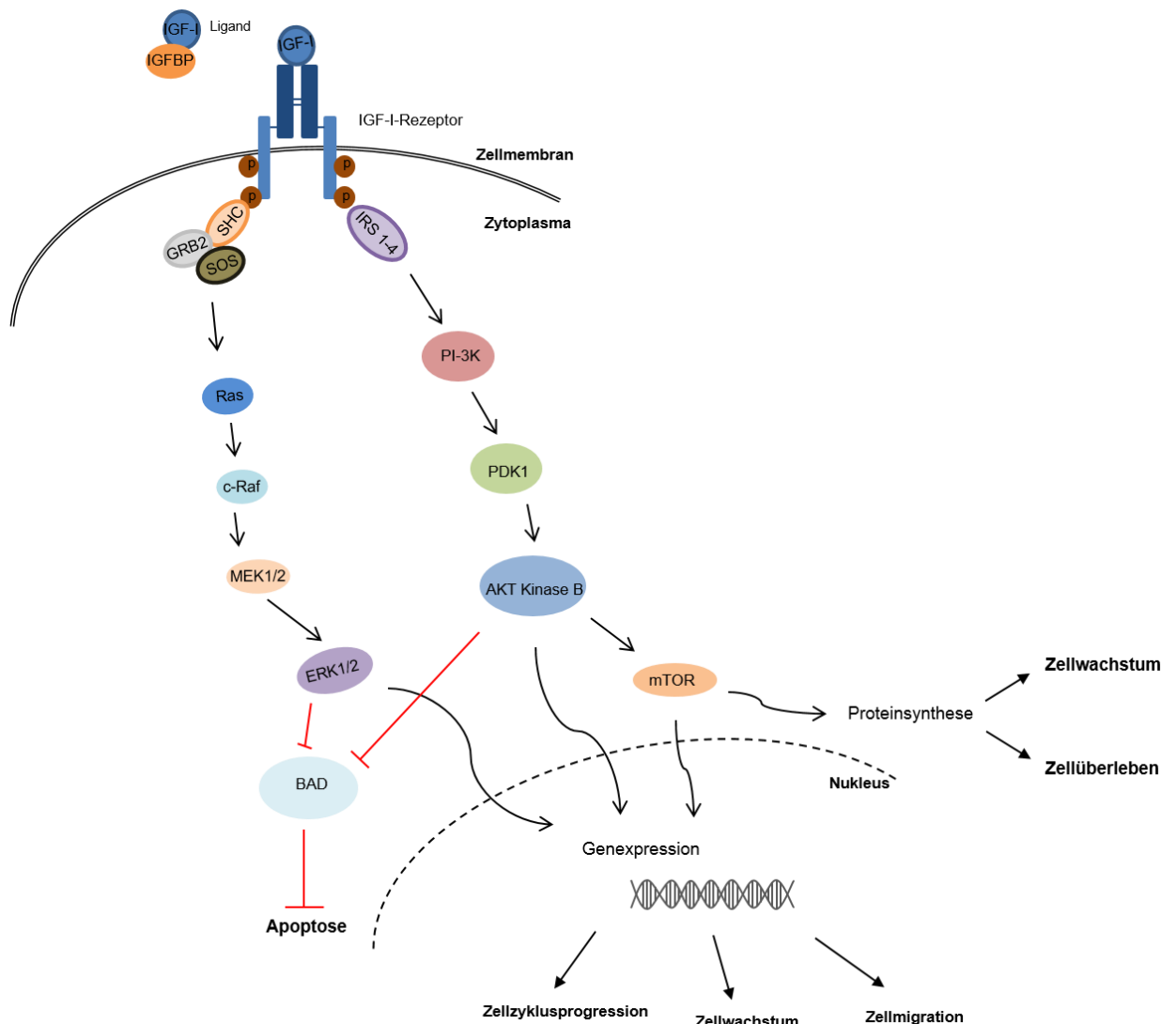
### **1.3 Der *insulin-like growth factor I* receptor**

#### **1.3.1 Der IGF-IR-vermittelte Signalweg**

Das IGF-System stellt ein komplexes intrazelluläres Netzwerk dar, über welches Wachstumssignale vermittelt werden. Es spielt eine wichtige Rolle in vielen physiologischen Entwicklungsprozessen wie beispielsweise der Steuerung von Wachstum und Differenzierung während der Embryogenese oder der Wundheilung durch Anregung der Fibroblasten Proliferation in Keratinozyten abgeleiteten Keloidgeweben (LeRoith, 2000; Phan et al., 2003).

Das IGF-System setzt sich aus den zellmembranständigen Glykopeptid-Rezeptoren *insulin-like growth factor* I, -II (IGF-IR, IGF-IIR), dem Insulin-Rezeptor (IR), den Peptidliganden IGF-I, IGF-II (bzw. Somatomedin) und 6 verschiedenen IGF-Bindungsproteinen IGFBP-1 bis -6 zusammen. Nach seiner Entdeckung um 1974 wurde IGF-IR 1986 erstmals kloniert und sequenziert (Ullrich et al., 1986). Funktionell gehört IGF-IR zu den Typ 2 Tyrosinkinase-Rezeptoren und weist auf Aminosäuresequenzniveau eine 62 %ige Homologie zu IGF-IIR sowie 60 %ige Homologie zu IR auf (Samani et al., 2006). Angesichts seiner wachstumsfördernden Funktion wird die Genexpression von IGF-IR über weitere Wachstumsfaktoren wie EGF, PDGF und FGF sowie Glucocorticoide, Estrogene und Schilddrüsenhormone reguliert (Yu et al., 2000). Als reifes membranverankertes Heterotetramer besteht IGF-IR aus zwei 130-135 kDA großen  $\alpha$ -Ketten ( $\alpha$ -Untereinheiten) und zwei 90-95 kDA großen  $\beta$ -Ketten ( $\beta$ -Untereinheiten), die über Disulfidbrücken mit- und untereinander verbunden sind (Massague et al., 1982). Die extrazellulär lokalisierten  $\alpha$ -Untereinheiten sind dabei an der Ausbildung der Ligandenbindungsdomäne und die intrazellulär gelegenen  $\beta$ -

Untereinheiten an der Signaltransduktion beteiligt (Garrett et al., 1998). Nach Bindung von IGF-I oder IGF-II an die  $\alpha$ -Domänen kommt es durch Konformationsänderung zu einer Aktivierung der Rezeptorkinase, die eine Autophosphorylierung der Tyrosinreste (950) an den  $\beta$ -Domänen hervorruft. Die Phosphatreste stellen Bindungsstellen für weitere Substrate dar, die nach Andocken aktiviert werden und die zytosolische Phosphorylierungskaskade in Richtung Zellkern fortleiten (Abb. 4).



**Abb. 4: Darstellung des IGF-IR-vermittelten Signalwegs.** Schematische Darstellung des IGF-I-Rezeptors (dunkelblau,  $\alpha$ -Domänen; hellblau,  $\beta$ -Domänen). Die IGF-IR-Bindung gefolgt von der intrazellulären Signaltransduktion über die MAPK/ERK- (linke Bildhälfte) und PI-3K/AKT-Kaskade (rechte Bildhälfte) führt zur Induktion von Zellzyklusprogression, Zellüberleben, -migration und Zellwachstum. (Modifiziert nach Steelman et al. 2011 & Scartozzi et al. 2011).

Die PI-3K/AKT- sowie MAPK/ERK-vermittelten Signalkaskaden stellen dabei die zwei wesentlichen IGF-IR-abhängigen Signalwege dar. Der PI-3K/AKT-Signalweg wird über Bindung von PI-3K an die Insulin-Rezeptor-Substrate 1-4 (IRS 1-4) eingeleitet. Nach Konformationsänderung von PI-3K schließt sich die Aktivierung weiterer Moleküle wie PDK-1 und AKT-Kinase B an. Über die Serin/Threonin-abhängige AKT-Kinase B kann es schließlich über die Inaktivierung von BAD zur Unterdrückung der Apoptose und gleichzeitig über die Aktivierung von mTOR zur Zellzyklusprogression und Förderung des Zellwachstums kommen (Steelmann et al., 2011).

Der MAPK/ERK-Signalweg startet durch SHC-Bindung an den IGF-I-Rezeptor. Die anschließende Komplexbildung mit dem Adapterproteinen GRB2 und SOS führt zu einer Aktivierung der GTPase Ras, welche weitere *Downstream*-Moleküle wie c-Raf, MEK1/2 und die Serin/Threonin-Kinase ERK1/2 (bzw. p44- und p42-MAPK) phosphoryliert. Von den p44/p42-MAP-Kinasen geht die Aktivierung zahlreicher weiterer zytoplasmatischer und intranukleärer Substrate aus, sodass über die Induktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen mitogene Effekte wie Zellproliferation und -migration aufrechterhalten werden (Steelmann et al., 2011).

### 1.3.2 Funktion von IGF-IR in der Tumorprogression

Unter physiologischen Bedingungen unterliegt das IGF-System feinregulierten Kontrollmechanismen, sodass eine intrazelluläre Balance zwischen wachstumsfördernden und -hemmenden Effekten herrscht: Die IGF-II-Rezeptor-Isoform besitzt beispielsweise keine Tyrosinkinase Aktivität und schwächt durch kompetitive IGF-I- und IGF-II-Bindung mit anschließender Degradation die IGF-induzierte Signaltransduktion ab (Samani et al., 2006). Die IGFB-Proteine modifizieren die Signaltransmission, indem sie die IGF-Liganden in unterschiedlich starker Affinität binden und zum Rezeptor transportieren (Clemmons et al., 1998) oder, wie für IGFBP3- in NSCLC-Zellen beschrieben wurde, negativ in die MAPK/ERK- und PI-3K/AKT-Signalwege eingreifen (Lee et al., 2002).

Vor dem Hintergrund, dass über das IGF-System zahlreiche intrazelluläre metabolische und mitogene Signale vermittelt werden, ist eine potentielle Rolle von IGF-IR in der Tumorentstehung und -progression früh diskutiert worden. Die Forschungsgruppe von Kalebic et al. hat bereits 1994 durch den *in vivo*-Nachweis der Wachstumsreduktion von humanen Rhabdomyosarkomen unter IGF-IR-Hemmung demonstriert, dass die IGF-IR-Achse eine essentielle Funktion im Tumorwachstumsprozess besitzt. Anhand zahlreicher Studien ist eine erhöhte Expression von IGF-IR in verschiedenen Tumorentitäten wie Mamma-, Ovarial-, Pankreas- und kolorektalen Karzinomen sowie

Glioblastomen, Neuroblastomen und Meningeomen nachgewiesen worden, welches die Hypothese einer parakrinen Rolle des Rezeptors in der Tumorbildung unterstützt (Perks et al., 2003; Hartmann et al., 2005). Eine proinvasive Funktion von IGF-IR über AKT/mTor-induzierte Matrix-Metalloproteinase MMP-2- und MT1-MMP-Expression haben *in vitro*-Analysen mit hoch-invasiven H-59 Lewis-Lungenkarzinomzellen zeigen können (Zhang D & Brodt, 2003). Darüber hinaus ist die IGF-IR-Achse in der Entwicklung von Chemoresistenzen diskutiert worden. Hierbei ist von Interesse, dass chemoresistente Tumorzellen eine erhöhte Aktivität des IGF-IR-Signalwegs aufweisen und dass die Hemmung von IGF-IR oder das gezielte Inhibieren der IGF-IR-Signalwegskomponenten eine Chemosensibilisierung zur Folge hat (Sekharam et al., 2003; Garcia-Echeverria et al., 2004; Baserga, 2005). Im Kontext mit p73 hat unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich einen DNp73-abhängigen und über Aktivierung der IGF-IR-AKT/STAT3-Achse regulierten Invasions- und Metastasierungsweg in Melanomzellen nachgewiesen (Steder et al., 2013).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die bisher nur teilweise verstandenen, vielfältigen Funktionen der antagonistischen p53-Familienmitglieder und das seit Ende der 90er Jahre aufgekommene Interesse an miRs eröffnet für die Forschung ein weites Feld. Einerseits werden durch die Aufdeckung von unbekannten Signalwegen weitere Bausteine für das Verständnis von Tumorenstehung und -progression geliefert, andererseits werden sich damit in naher Zukunft eventuelle gentherapeutische Behandlungsmethoden als Alternative zu herkömmlichen Chemo- und Radiotherapien ermöglicht.

Der Tumorsuppressor p73 stellt hierbei ein wichtiges Signalprotein dar. Im Gegensatz zu p53 ist p73 in Tumoren nur in wenigen Ausnahmefällen von Mutationen betroffen. Stattdessen kommt es durch die gleichzeitige Anwesenheit der antagonistischen N-terminal verkürzten p73-Isoformen zu einer funktionellen Inaktivierung der p53/p73-Wildtypproteine. Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass gerade Melanomzellen mit hoher p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$ -Expression eine gesteigerte Chemoresistenz aufweisen (Stiewe et al., 2002; Emmrich et al., 2009). Vor diesem Hintergrund beschäftigen wir uns seit längerem mit der Aufdeckung p73-vermittelter Apoptose-induzierender Signalwege mit dem Ziel, diese gezielt während der herkömmlichen Zytostatikatherapie zu aktivieren bzw. DNp73-induzierte Resistenzmechanismen zu unterbinden und so eine effiziente Behandlung zu ermöglichen. Dabei liegt der Fokus insbesondere auf der Identifizierung p73-regulierter miRs, die in Tumorzellen unabhängig von funktionell inaktivem p53 chemosensibilisierend wirken können. Beim Screening von p73-regulierten miRs hatten *TaqMan®-MicroArray*-Analysen in SK-Mel-29-Zellen nach ektopter p73-Überexpression signifikant erhöhte Level der miR-885-5p ergeben. Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, miR-885 als potentielle Zielstruktur von p73 in unterschiedlich aggressiven Lungen- (A549, H1299), Melanom- (SK-Mel-29, SK-Mel-147, WM-793) und Brustkrebszellen (MDA-MB-231) zu charakterisieren. Die Untersuchungen umfassen miR-885-Expressionsanalysen unter Überexpression sowie nach Inhibition von p73 und DNp73. Im Fokus stand die Regulation der IGF-IR-Expression sowie Aktivität des Signalwegs durch p73/DNp73 und miR-885. Auf funktioneller Ebene wurde dabei das zelluläre Verhalten hinsichtlich Migration, Invasivität und Ansprechen auf Chemotherapeutika unter stabiler Überexpression von miR-885 untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Instrumente

Gerätename	Geräteart	Hersteller
<b>Axiovert 40C</b>	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
<b>Axiovert 25</b>	Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
<b>BioPhotometer</b>	Photometer	Eppendorf (Hamburg)
<b>Bakterieninkubator</b>	Inkubator	Kendro (Langenselbold)
<b>Celloshaker</b>	Schüttler	Renner GmbH (Dannstadt)
<b>Centrifuge 5417R</b>	Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
<b>Centrifuge 5415D</b>	Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
<b>Curix 60</b>	Filmentwicklungsmaschine	AGFA Health Care (Berlin)
<b>DPU-414 Thermal Printer</b>	Drucker	(SII) Seiko Instruments GmbH (Neu-Isenburg)
<b>Opticon®2</b>	<i>real-time</i> PCR	MJ Research Inc. (USA, Waltham)
<b>FACSCalibur</b>	Durchflusszytometer	BD (Heidelberg)
<b>Flex Cycler</b>	Thermozykler	Analytik Jena
<b>Hera Cell 240</b>	CO <sup>2</sup> -Inkubator	Haereus (Osterode)
<b>HBO 50</b>	Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Göttingen)
<b>Hera Safe</b>	Zellkultur-Werkbank	Heraeus (Osterode)
<b>iCycler</b>	Thermozykler	Bio-Rad (München)
<b>Julabo 5</b>	Wasserbad	Memmert GmbH (Schwabach)
<b>Mastercycler gradient</b>	Thermozykler	Eppendorf (Hamburg)
<b>MicroCam 3.3</b>	Digitalkamera	dhs (Greifenstein-Beilstein)



<b>Microplate Reader Benchmark</b>	Spektralphotometer	Bio-Rad (München)
<b>Mini-PROTEAN® 3 Tetra Cell</b>	System für vertikale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
<b>Multifuge 3L-R</b>	Zentrifuge	Haereus (Osterode)
<b>Mikrowelle</b>	Mikrowelle	Sharp (Hamburg)
<b>MyCycler</b>	Thermozykler	Bio-Rad (München)
<b>Nanodrop® ND1000</b>	Spektralphotometer	PEQLAB (Erlangen)
<b>Power Pack P25 Standard</b>	Stromnetzgerät	Biometra (Göttingen)
<b>Pico 17 Centrifuge</b>	Tischzentrifuge	Heraeus (Osterode)
<b>Rührfisch Terra</b>	Magnet-Rührfisch-Platte	Thermo Fisher scientific (Schwerte)
<b>7900 HT Fast real-time PCR System</b>	Thermozykler	(AB)Applied Biosystems® (Darmstadt)
<b>S@felow 1.2</b>	Zellkultur-Werkbank	Nunc (Wiesbaden)
<b>Shaker TH15</b>	Inkubationsschüttler	Edmund Buehler (Tübingen)
<b>Sub-Cell DNA GT System</b>	System für horizontale Gelelektrophorese	Bio-Rad (München)
<b>Thermo mixer 5436 comfort</b>	Thermomixer	Eppendorf (Hamburg)
<b>Trans-Blot SD System</b>	Blot-Kammer	Bio-Rad (München)
<b>UV solo TS Imaging System</b>	UV-Transilluminator	Biometra (Göttingen)
<b>UV Cleaner UV/CTAR</b>	UV-Werkbank	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
<b>Vortex GENIE®2</b>	Vortexter	Scientific Industries (USA, New York)
<b>VWR TM Galaxy Ministar</b>	Tischzentrifuge	Van Waters & Rogers (USA, Californien)
<b>Waage Kern 572</b>	Waage	KERN & SOHN GmbH (Balingen-Frommern)

### 2.1.2 Enzyme, Chemikalien und Puffer

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Freiburg), Bio-Rad (München), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland), Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), PAA (Pasching, Österreich), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg) und Sigma (München). Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Standardprotokollen hergestellt (Sambrook et al., 1989). DNA-modifizierte Enzyme und Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Promega (Mannheim) und Stratagene (Heidelberg) bezogen.

### 2.1.3 Kits

Name	Hersteller
<b>BLOCK-iT™ U6 RNAi Entry Vector Kit</b>	Invitrogen™ (Karlsruhe)
<b>ECL Plus Western Blotting Detection System</b>	Amersham Biosciences (Freiburg)
<b>First Strand cDNA Synthesis Kit</b>	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
<b>Nucleo Spin® miR</b>	Mascherey-Nagel (Düren)
<b>TaqMan® Small RNA assays</b>	(AB)Applied Biosystems® (Darmstadt)
<b>TaqMan® Micro RNA Reverse Transkription</b>	(AB)Applied Biosystems® (Darmstadt)
<b>TaqMan® Universal PCR Master Mix</b>	Invitrogen™ (Karlsruhe)
<b>TACS® XTT Cell Proliferation Assay</b>	Trevigen (Gaithersburg, Maryland US)
<b>iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix</b>	Bio-Rad (München)
<b>SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate</b>	Pierce (Bonn)
<b>SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate</b>	Pierce (Bonn)
<b>peq Gold PCR Hot Start Mix Y</b>	PEQLAP (Erlangen)
<b>TuroboFect™ Transfection Reagent</b>	Fermentas (St. Leon-Rot)

## 2.1.4 Plasmide

Bezeichnung	Quelle
<b>pWPXL</b>	Klonierungsvektor (10510 bp) mit EF-1 $\alpha$ Promotor & Intron zur Herstellung von Expressionsvektoren (Invitrogen, Karlsruhe)

## 2.1.5 Adenoviren

Virusvektor	Quelle
<b>Ad.GFP</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert das grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des CMV-Promoters (Pützer et al., 2000)
<b>Ad.TAp73</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert als Fusionsprotein die C-terminale p73 $\beta$ -Isoform und GFP unter Kontrolle des CMV-Promoters (Stiewe et al., 2002)
<b>Ad.<math>\Delta</math>TAp73</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert als Fusionsprotein die N-terminale $\Delta$ Ex2/3p73 $\beta$ -Isoform und GFP unter Kontrolle des CMV-Promoters (Stiewe et al., 2002)
<b>Ad.shGFP</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der GFP-Expression (RNAi) (Stanelle et al., 2005) Negativkontrolle (Stanelle et al., 2005)
<b>Ad.shp73</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert shRNA zur Hemmung der p73-Expression (RNAi) (Buhlmann et al., 2008)
<b>Ad.TAp53</b>	Adenoviraler Erstgenerationsvektor, exprimiert als Fusionsprotein p53 unter Kontrolle des CMV-Promoters (Stiewe et al., 2002a)

## 2.1.6 Lentiviren

Bezeichnung	Beschreibung
<b>LV.WPXL-scr</b>	Lentiviraler Expressionsvektor, exprimiert keine spezifische miR, verwendet als Kontrollinfektion

**LV.WPXL-885**

Lentiviraler Expressionsvektor,  
exprimiert miR-885, stabile  
Überexpression

## 2.1.7 Zelllinien

Linie	Beschreibung	Medium
<b>SK-Mel-147</b>	Humane Melanom-Zelllinie erhalten von María S. Soengas, urspr. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA (Wolter et al., 2007)	DMEM + Sodium Pyruvate + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml)
<b>SK-Mel-29</b>	Humane Melanom-Zelllinie erhalten von María S. Soengas, urspr. Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, USA (Wolter et al., 2007)	DMEM + Sodium Pyruvate + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml)
<b>WM-793</b>	Humane Melanom-Zelllinie (vertikale Phase) Dr. Meenhard Herlyn The Wistar Institute, Philadelphia, PA (Fang et al., 2001)	DMEM + Sodium Pyruvate + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml)
<b>MDA-MB-231</b>	Humane Adenokarzinom Brustkrebs-Zelllinie (Lacroix et al., 2004)	DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
<b>H1299</b>	Humane NSCLC-Zelllinie (Leung et al., 2010)	DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)
<b>A549</b>	Humane NSCLC-Zelllinie (Leung et al., 2010)	DMEM + 10 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin (100x) + 0,5 % Amphotericin B (250 µg/ml) + 1 % Nicht-essentielle Aminosäuren (100x)

## 2.1.8 Antikörper

Primärer Antikörper	Beschreibung	Quelle
<b>IGF1-R <math>\beta</math></b>	Polyklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen den C-Terminus der $\beta$ -Untereinheit des humanen IGF-I-Rezeptors	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>p-IGF1-R <math>\beta</math></b>	Polyklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen die phosphorylierte Aminosäure Tyrosin (Stelle 1135) der $\beta$ -Untereinheit des humanen IGF-I-Rezeptors	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>P44/42 MAPK Thr202/Tyr204</b>	Polyklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen die humanen MAP-Kinasen ERK 1 & 2	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>p-P44/42 MAPK Thr202/Tyr204</b>	Polyklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen die phosphorylierten Aminosäuren Threonin und Tyrosin (Stelle 202-204) der humanen MAP-Kinasen ERK 1 & 2	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>AKT (pan)</b>	Monoklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen die humane AKT-Kinase	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>p-AKT Thr.308</b>	Polyklonaler AK (Kaninchen) gerichtet gegen die phosphorylierte Aminosäure Threonin (Stelle 308) der humanen AKT-Kinase	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>p73 ER-15</b>	Monoklonaler AK (Maus) reagiert mit Epitop (AS-367-380) humaner N- und C-terminaler p73 $\alpha$ / $\beta$ -Isoformen	Becton Dickinson Biosciences (Heidelberg)
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	Monoklonaler AK (Kaninchen) humanes $\beta$ -Aktin	Cell Signaling (Frankfurt am Main)

Sekundärer Antikörper	Beschreibung	Quelle
<b>Ziege anti-Kaninchen IgG</b>	Konjugiert an HRP	Cell Signaling (Frankfurt am Main)
<b>Pferd anti-Maus IgG</b>	Konjugiert an HRP	Cell Signaling (Frankfurt am Main)

### 2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide für verschiedene PCRs bestellt bei Metabion

Gen	Sequenz
<b>TP73</b>	SE 5'-TCTACTGCCAGATCGCCAAGACAT-3' AS 5'-TGGAGCAGACTGTCCTTCGTTGA-3'
<b>ΔEx2/3p73β</b>	SE 5'-TCTACTGCCAGATCGCCAAGACAT-3' AS 5'-TGGAGCAGACTGTCCTTCGTTGA-3'
<b>TP53</b>	SE 5'-CTCAGACTGACATTCTCCAC-3' AS 5'-ACTCTGTGAGGTAGGTGCAA-3'
<b>18S rRNA</b>	SE 5'-ACCAGAGCGAAAGCATTGCCA-3' AS 5'-TCGGCATCGTTTATGGTCGGAA-3'
<b>CTNNB1</b>	SE 5'-TCGAGGACGGTCGGACT-3' AS 5'-ATTGTCCACGCTGGATTTTC-3'
<b>OXR1</b>	SE 5'-ATCAAGCAGCAGCCAGAGAA-3' AS 5'-TCAGACTCCAGGTCTGCTTTC-3'
<b>CDK2</b>	SE 5'-TACACCCATGAGGTGGTGAC-3' AS 5'-GAATCTCCAGGGAATAGGGC-3'
<b>IGFI-R</b>	SE 5'-CGATGTGTGAGAAGACCACC-3' AS 5'-TGGCAGCACTCATTGTTCTC-3'

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkulturarbeiten und Funktionsanalysen

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung der Zellen

Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinien (2.1.7) wurden auf Zellkulturschalen (10-20 cm<sup>2</sup>) zusammen mit dem entsprechenden Nährmedium in Zellinkubatoren bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Nährmedium (siehe Tabelle 2.1.7) setzte sich je nach Zelllinie unter anderem aus 2 mM L-Glutamin, 1x MEM *non-essential amino acids*

(PAA, Pasching, Österreich), 10 % fötales Kälberserum (FCS), 100 µg/ml Penicillin, 1,25 µg/ml Amphotericin B und 100 U/ml Streptomycin zusammen. Nach Erreichen eines konfluierend wachsenden Zellrasens (alle 3-4 Tage) wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen unter der Zellwerkbank passagiert. Nach Aspiration des Mediums wurden die Zellen mit 5-10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 5-10 min bei RT inkubiert, sodass die Zellen von der Zellkulturschale gelöst werden konnten. Dann wurden die gelösten Zellen in 2-5 ml frischem Nährmedium aufgenommen, aliquotiert und anschließend auf neue Zellkulturschalen mit 10-20 ml Nährmedium ausgesät. Zur längerfristigen Lagerung bei -80°C wurden die trypsinisierten Zellen mit 5 ml Medium aufgenommen, in 15-ml-Falcons überführt und auf 1200 UpM für 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend mit 1,5 ml Nährmedium und zusätzlich mit 10 % DMSO (150 µl) vermischt, in ein Kryokonservierungsröhrchen überführt und sofort bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Zellzahlbestimmung und Aussaat

Die Zellzahl wurde lichtmikroskopisch mittels Neubauer-Zählkammer (Hämozytometer) bestimmt. Nach Trypsinisierung und dreiminütiger Zentrifugation (800 UpM; 4 °C) wurde das gewonnene Zellpellet mit 10 ml Medium resuspendiert und davon wurden anschließend 40 µl mit 40 µl Trypanblau-Farbstoff 1:1 in einem Eppendorfröhrchen gemischt. 10 µl des Aliquots wurden auf die Zählkammer pipettiert und die vitalen, ungefärbten Zellen in vier Quadraten (je 1 mm<sup>2</sup>) gezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Durchschnittliche Zellzahl} \times \text{VF} \times 10^4 = \text{Zellen/ml}$$

Die je nach Experiment und Größe der Zellkulturplatte benötigte Zellmenge ( $1 \times 10^5$  bis  $3,5 \times 10^6$ ) wurde im entsprechenden Zellmediumvolumen aufgenommen, sorgfältig auf der Kulturplatte ausgesät und über Nacht im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 2.2.1.3 Zellernte

Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst, die Zellsuspension in 15-ml-Falcons überführt und für 3 Minuten bei 1200 UpM und 4 °C zentrifugiert. Dann wurde das Pellet mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (3 min, 1200 UpM, 4 °C). Im Anschluss konnte das Zellpellet für die RNA-bzw. Proteinisolierung verwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden.

#### 2.2.1.4 Transiente Zelltransfektion

Bei einer Transfektion wird mit Hilfe eines Plasmids entweder DNA oder RNA transient in eukaryotische Wirtszellen eingeschleust. Dafür wurde eine bestimmte ( $8 \times 10^5$ ) Anzahl von Zellen auf einer 60-mm-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Transfektionsansatz bestehend aus TurboFect™ Transfection Reagent (Fermentas), SFM (Serum freien Medium) sowie dem Plasmid mit einem Gesamtvolumen von 500 µl nach Herstellerangaben vorbereitet. Die Zellen wurden im Anschluss transfiziert und bis zu einem bestimmten Zeitpunkt im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

#### 2.2.1.5 Migrationsanalyse (*scratch assay*)

Um das Migrationsverhalten von Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen, wurde der „*scratch assay*“ bzw. „*woundhealing assay*“ durchgeführt. Dafür wurde eine bestimmte Anzahl von Zellen ( $1,5 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$ ) in insgesamt 3 ml Medium auf einer 6-Multiwell-Zellkulturplatte (Greiner, bio-one) jeweils in Triplikaten gleichmäßig verteilt und über Nacht im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden unter sterilen Bedingungen mit einer 10-µl- und einer 100-µl-Pipettenspitze pro Well 3 Kratzer senkrecht durch den konfluenten Zellrasen gezogen. Die entstandenen Lücken bzw. „intakten“ Wundflächen wurden unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und im Anschluss wurden drei waagerechte Striche unter der 6-Multiwellplatte mit einem Stift zur späteren Orientierung gezogen. Dann wurden 3 ml frisches Medium, welches 1-2 µl Mitomycin C oder nur 0,5 % statt 10 % FCS enthielt, auf die Wells gegeben, um die Proliferation der Zellen annähernd zu unterdrücken. Die anschließende Fotodokumentation (AxioVision LE, Carl Zeiss) der Wundflächen an den zuvor markierten Stellen erfolgte lichtmikroskopisch nach 0 und 24 Stunden. Mit Hilfe des Bildbearbeitungs- und -verarbeitungsprogrammes ImageJ (Wayne Rasband, USA) wurden die Flächen ausgemessen bzw. skaliert und die relative Migration nach 24 h berechnet.

$$\frac{\text{MW (24 h Fläche)}}{\text{MW (0 h Fläche)}} \times 100 = \text{Fläche nach 24 h in \%}$$

$$100 \% \text{-Fläche nach 24 h in \%} = \text{relative Migration in \%}$$



#### 2.2.1.6 Proliferationsanalyse (*XTT assay*)

Die Zellproliferation wurde mit Hilfe des TACS® XTT Cell Proliferation Assay Kits (Treviagen) quantifiziert. Bei dieser Methode wird die Intensität eines Farbumschlags, die sich direkt proportional zur Zellviabilität verhält, nach bestimmten Zeitpunkten photometrisch gemessen. Der verwendete gelbe Farbstoff XTT (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) diente hierbei als Indikator, da er nur von mitochondrialen Enzymen vitaler, metabolisch aktiver Zellen zu einer wasserlöslichen orangen Farbe reduziert werden kann. Die Analyse wurde auf einer 96-Well-Zellkulturplatte (Greiner, bio-one) durchgeführt: In einer waagerechten 12-Well-Reihe lag eine Zelllinie in steigender Anzahl (5.000, 10.000, 15.000, 20.000) in Triplikaten vor. Da die Proliferationsrate zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 24, 48, 72 h) gemessen wurde, lagen pro Zelllinie 4 Reihen vor. Zuerst wurde die Zellzahl bestimmt, die benötigte Menge auf ein Volumen von 200 µl pro Well berechnet und anschließend wurden die Zellen mithilfe einer 100-µl-Mehrkanalpipette unter sterilen Bedingungen auf die entsprechenden Wells überführt. Nach Inkubation über Nacht (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde der XTT-Mix des TACS® XTT Cell Proliferation Assay Kits (Treviagen) am nächsten Tag angesetzt und auf das Medium der Wells pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation im Zellinkubator wurde der XTT enthaltene Zellüberstand auf eine weitere 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Die Messung der OD erfolgte im Photometer (Microplate Reader Benchmark, Bio-Rad) bei 450 und 490 nm.

XTT-Mix (für 20 Wells):	20 µl Aktivator (25x)
	980 µl XTT
	<b>50 µl pro Well</b>

#### 2.2.1.7 Matrigel-Invasionsanalyse (*Boyden Chamber assay*)

Die Matrigel Invasionsanalyse ist eine gebräuchliche Methode, das Invasionsverhalten von Tumorzellen *in vitro* zu untersuchen. Die Boyden-Chamber besteht aus einem zylindrischen Insert, das an seinem Boden eine Polykarbonatmembran mit Poren definierter Größe besitzt und in einem Well einer Multiwell-Zellkulturplatte eingehängt wird. Das im Insert eingebettete Matrigel imitiert die Gewebematrix, durch welche die Zellen chemotaktisch gerichtet wandern und nach Passieren der Poren quantifiziert werden können. In dieser Arbeit wurden 6-Multiwell-Inserts mit einer 8,0 µm durchmessenden Porengröße verwendet. Zuerst wurde das Gel gegossen. Dafür wurde das Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Mix, 5 ml) aufgetaut, aliquotiert und

mit FKS freiem Medium (SFM) in einem Verhältnis von 1:3 vermischt. Pro Well wurde ein Volumen von 400 µl gleichmäßig auf dem Boden des Inserts verteilt und für eine Stunde im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das getrocknete Matrigel wurde vorsichtig mit SFM gewaschen und unter das Insert 3 ml 30 % FKS Medium pipettiert. Schließlich wurde 1 ml SFM auf das Matrigel gegeben und zurück in den Inkubator gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen trypsinisiert, abzentrifugiert, in SFM resuspendiert und ausgezählt. Der Zellansatz ( $20 \times 10^4$ ) wurde auf ein Volumen von insgesamt 1 ml SFM verdünnt, auf die vorgewärmten Inserts pipettiert und für 24-36 h im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Um die invadierten Zellen sichtbar zu machen, wurden sie nach Entfernung des Matrigels mit einem Q-Tip durch den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), der in die DNA interkaliert, angefärbt. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnten die invadierten Zellen fotodokumentiert und quantifiziert werden.

#### 2.2.1.8 Chemosensibilitätsanalyse

Die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Zytostatika wird als Chemosensibilität bezeichnet und kann durch die Messung der Apoptoserate mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt werden. In dieser Arbeit wurden die gebräuchlichen Zytostatika Cisplatin (cDDP), welches durch Hemmung der DNA-Replikation die Apoptose in den Zellen einleitet, und Doxorubicin in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet. Nach Zellzahlbestimmung wurden die Zellen gleichmäßig auf einer 6-cm-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die FACS-Messung wurden von jeder Kondition Duplikate angefertigt. Vor der Zytostatika-Behandlung wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums einmal mit PBS gewaschen, mit der entsprechenden in 5 ml Medium gelösten cDDP- und Doxorubicin-Konzentration behandelt und schließlich für 48 h im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die Zellernte wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: Der gesamte Zellüberstand wurde in einen 15-ml-Falcon überführt und die Zellplatte einmal mit 2 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls in den Falcon pipettiert wurde. Nach 5-10 minütiger Inkubation mit 0,5 ml Trypsin wurden die gelösten Zellen mittels 1 ml Zellüberstand in den Falcon aufgenommen. Die Platte wurde noch einmal mit 1 ml PBS gewaschen, welches wiederum in den Falcon übertragen wurde. Dann wurde die Zellsuspension für 8 min bei 1200 UpM und 4 °C zentrifugiert, das erhaltene Zellpellet mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5-ml-Eppendorfröhrchen überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 8 Minuten (3,6 UpmM, 4 °C) wurde das PBS abgesaugt und das Pellet mit 100 µl PBS und 1 ml

eiskaltem 70 %igem Ethanol gelöst. Die Lagerung bis zur FACS-Messung erfolgte bei 20 °C für mind. 24 h. Für die Vorbereitung zur FACS-Analyse wurden die in 70 %igem Ethanol fixierten Zellen auf Eis aufgetaut und für 8 min bei 4600 Upm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (8 min, 4600 UpM, 4 °C). Danach wurde das Pellet mit 500 µl PI-Färbelösung (445 µl PBS, 50 µl Propidiumiodid, 5 µl RNase A) aufgelöst, in ein FACS-Röhrchen überführt und bei RT für mind. 30 min abgedunkelt inkubiert. Bei Propidiumiodid (PI) handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert. In den apoptotischen Zellen ist die DNA degradiert worden; folglich kann Propidiumiodid dort nicht mehr effizient in die DNA interkalieren und die Zellen enthalten damit weniger Propidiumiodid im Vergleich zu den vitalen Zellen. Bei der Durchflusszytometrie (FacsCalibur, Heidelberg) werden die Zellen durch Fluoreszenzanregung über den Argon-Ionenlaser bei 488 nm detektiert und dabei in Abhängigkeit des Fluoreszenzgehaltes sortiert. Pro Messung wurden 10.000 *events* erfasst und die Zellverteilung in einem Histogramm dargestellt. Die Fraktion der apoptotischen Zellen bildete hierbei den charakteristischen Sub-G1-Peak.

## 2.2.2 Adenovirale Arbeitstechniken

### 2.2.2.1 Titer verwendeter Viren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren standen in der Abteilung zu Verfügung. Die Virustiter wurden mithilfe einer seriellen Verdünnung in 96-Well-Zellkulturplatten und einer DNA-Konzentrationsmessung im Photometer bei 260 nm bestimmt. Die Virustiter sind in folgender Tabelle aufgeführt:

Virus	Beschreibung	Titer in pfu/ml
<b>Ad.GFP</b>	exprimiert GFP	$1 \times 10^{10}$
<b>Ad.TAp73β</b>	exprimiert Fusionsprotein aus TAp73β und GFP	$5,4 \times 10^9$
<b>Ad.ΔTAp73</b>	exprimiert Fusionsprotein aus TAp73ΔEx2/3β und GFP	$1 \times 10^{10}$
<b>Ad.TAp53</b>	exprimiert TAp53	$5 \times 10^9$
<b>Ad.shGFP</b>	exprimiert shRNA zur Hemmung der GFP-Expression (RNAi), Negativkontrolle	$1 \times 10^{10}$

---

<b>Ad.shp73</b>	exprimiert shRNA zur Hemmung der p73-Expression (RNAi)	$3 \times 10^9$
-----------------	--	-----------------

---

#### 2.2.2.2 Transduktion

Die Transduktion stellt eine gängige und effiziente Methode dar, genetisches Material mit Hilfe eines viralen Vektors in eukaryotische Zellen zu schleusen und dort transient zu exprimieren. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die benötigte Zellmenge auf 10-cm-oder 20-cm-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Zellinkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die adenovirale Transduktion wurde der Virustiter photometrisch bestimmt. Um eine maximale Transduktionseffizienz zu erreichen, wurde die benötigte Virusmenge mit der für jede Zelllinie entsprechenden Infektionsmultiplizität (MOI) und der Anzahl der zu infizierenden Zellen wie folgt berechnet:

$$\text{Virusmenge } (\mu\text{l}) = \frac{\text{MOI (pfu)} \times \text{Zellanzahl}}{\text{Virustiter } \left(\frac{\text{pfu}}{\text{ml}}\right)}$$

Zelllinie	MOI
<b>SK-Mel-29</b>	5
<b>SK-Mel-147</b>	10
<b>MDA-MB-231</b>	2,5
<b>A549</b>	5
<b>H1299</b>	5

---

Unter sterilen Bedingungen wurde das Zellmedium abgesaugt, die kalkulierte Virusmenge in 1 ml Medium überführt und tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Im Anschluss wurden die Zellkulturplatten 30 min im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, danach mit Medium aufgefüllt und für weitere 36-48 h im Zellinkubator inkubiert. Der Transduktionserfolg wurde sowohl lichtmikroskopisch durch Nachweis von GFP als auch auf DNA- und Protein-Ebene überprüft.

#### 2.2.3 Lentivirale Arbeitstechniken

##### 2.2.3.1 Herstellung lentiviraler Vektoren

Die Produktion lentiviraler Vektoren erfolgte durch eine Calcium-Phosphat-Transfektion von HEK 293T-Zellen. Am ersten Tag wurden 6 Mio. HEK 293T-Zellen auf

145 x 20 mm-Platten ausgesät (2.2.1.2). Am nächsten Tag wurde das Nährmedium der Zellen gewechselt und durch Medium mit 10 % FCS ohne Antibiotika ersetzt. Das benötigte Transfektionsgemisch wurde wie folgt vorbereitet:

Transferplasmid (pWPXL)	40 µg
Verpackungsplasmid (psPAX2)	30 µg
Hüllplasmid (pMD2.G)	12 µg
2,5 M CCS	100 µl
dd H <sub>2</sub> O (autoklaviert)	x µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>1000 µl</b>

Calcium Chlorid (CCS) Lösung: 36,75 g (2,5 M CaCl<sub>2</sub>)  
100 ml dd H<sub>2</sub>O (autoklaviert)  
durch einen sterilen 0,2-µm-Filter filtriert.

2 x HEPES Puffer (HBS) (pH 7,05-7,11) 8 g NaCl  
0,38 g KCl  
0,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
5 g HEPES  
1 g Glucose  
500 ml dd H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (autoklaviert)  
durch einen sterilen 0,2-µm-Filter filtriert.

Im Anschluss wurde es unter sorgfältigem Vortexen langsam zu 1 ml 2 x HBS Buffer gegeben, dann bei RT für max. 20 min inkubiert und schließlich tropfenweise auf die Zellen pipettiert. Nach 6-8 Stunden Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurde das Ca-PO<sub>4</sub> haltige Medium von den Platten entfernt, die Zellen wurden einmal mit 10 ml DMEM +SP (10 % FCS + AB) gewaschen und es wurden erneut je 20 ml DMEM +SP (10 % FCS + AB) auf die Platten gegeben. Nach 2 weiteren Tagen Inkubation wurde der das Lentivirus enthaltene Zellüberstand in ein 50-ml-Falcon überführt, bei 3000 UpM für 5 min bei RT zentrifugiert und anschließend durch einen 0,45-µm-Filter steril filtriert. Die Lagerung der produzierten Lentivirussuspension erfolgte bei -20 °C.

#### 2.2.3.2 Transduktion

Lentiviren besitzen die Fähigkeit, ihre RNA nach Eindringen in den Wirt in DNA umzuschreiben und stabil in dessen Genom einzubauen. Mit Hilfe der lentiviralen Infektion ist es daher möglich, genetisches Material in eukaryotische Zellen zu schleusen

und dort stabil zu exprimieren. Die lentivirale Transduktion erfolgte mit Schutzkleidung unter der Lentivirenwerkbank. Zu Beginn wurden die bei -20 °C gelagerte Lentivirussuspension im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, das nach Zellzahlbestimmung kalkulierte Zellvolumen in ein 15-ml-Eppendorfröhrchen überführt und bei 1200 UpM 3 min bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem das Zellpellet mit 200 µl Medium resuspendiert worden war, konnten 2-3 ml der Virussuspension hinzugegeben werden. Die gut vermischte Viruszellsuspension wurde anschließend auf eine 10-cm-Zellkulturplatte gegeben, für eine Stunde im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und schließlich mit 10 ml Medium aufgefüllt. Nach 3 Tagen wurden die infizierten Zellen zum ersten Mal passagiert und danach unter den üblichen Zellkulturbedingungen weiter kultiviert. Der Erfolg der lentiviralen Transduktion wurde nach 2 Zellpassagen auf RNA-Ebene mittels TaqMan® *real-time* PCR überprüft.

## 2.2.4 RNA-Arbeitstechniken

### 2.2.4.1 RNA-Isolierung

Mit Hilfe des NuclearSpin RNA Kits der Firma Macherey-Nagel erfolgte die Präparation der zellulären RNA aus Zellen. Nach Angaben des Herstellers wurde die RNA dabei in mehreren Einzelschritten in *Large*-RNA (total RNA/gesamte zelluläre mRNA der Zelle) und fraktionierte miR (*low molecular weight fraction*/zelluläre miR) aufgetrennt. Genomische DNA-Kontaminationen wurden mit dem RNase-free DNase Set (Quiagen, Hilden) unterbunden. Die aufgereinigte *Large*-RNA und miR wurde mit 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration sowie Qualität mittels Photometrie bestimmt. Anschließend wurde die gewonnene RNA bei -20 °C für weitere Expressionsanalysen gelagert.

### 2.2.4.2 Reverse Transkription für miR

Die Reverse Transkription (RT) ermöglicht es, RNA in cDNA zu transkribieren um damit weitere Genexpressionsanalysen durchzuführen. Nach dem Protokoll „Small RNA Assays Protocol“ (TaqMan®) wurde die vorher isolierte miR in cDNA umgeschrieben. Pro Probe wurden zwei getrennte Ansätze angesetzt: Der Erste mit dem spezifischen 5 x RT miR Primer und der Zweite mit dem 5 x RT RNU6B Primer als endogene Kontrolle.

Ein Reaktionsansatz wurde wie folgt angesetzt:

dNTPs 100 mM pro dNTP	0,15 µl
RNase Inhibitor 20 U/µl	0,19 µl

Multiscribe Reverse Transkriptase 50 U/ $\mu$ l	1,00 $\mu$ l
10 x Reverse Transkription Buffer	1,50 $\mu$ l
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	4,16 $\mu$ l
5 x RT Primer	3,00 $\mu$ l
20 ng Probe + x $\mu$ l H <sub>2</sub> O	5,00 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>15,00 <math>\mu</math>l</b>

Der Ansatz wurde im Thermozykler zu Beginn für 30 min bei 16 °C und im Anschluss für weitere 30 min bei 42 °C inkubiert. Es folgte eine fünfminütige Inaktivierung bei 85 °C. Die erhaltene cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt und für weitere Genexpressionsanalysen eingesetzt.

#### 2.2.4.3 Reverse Transkription für Gesamt-RNA

Die Reverse Transkription der isolierten *Large*-RNA erfolgte mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kits (Thermo Fisher Scientific, Schwerte).

Ein Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

dNTP Mix 10 mM pro dNTP	2,00 $\mu$ l
Ribolock RNase Inhibitor	1,00 $\mu$ l
M-MuLV Reverse Transkriptase	1,00 $\mu$ l
5 x Reaction Buffer	4,00 $\mu$ l
Nuklease freies H <sub>2</sub> O	1,00 $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>18</sub> Primer	1,00 $\mu$ l
1 $\mu$ g Probe+x $\mu$ l H <sub>2</sub> O	10,00 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,00 <math>\mu</math>l</b>

Der Ansatz wurde im Thermozykler zu Beginn für 60 min bei 37 °C inkubiert und dann für 5 min bei 70 °C inaktiviert. Die cDNA wurde ebenfalls bei -20 °C aufbewahrt und für weitere Genexpressionsanalysen verwendet.

#### 2.2.5 DNA-Arbeitstechniken

##### 2.2.5.1 DNA-Restriktion

Die DNA-Restriktion ist ein essentieller Schritt im Klonierungsprozess. Unter bestimmten Pufferbedingungen erkennen geeignete DNA-Restriktionsendonukleasen 4-8 Basenpaare innerhalb des DNA-Stranges und schneiden die spezifische Zielsequenz. Für die Restriktion von genomischer DNA bzw. von Plasmid-DNA zur

Verifikation der Klonierung wurde 1 µg DNA mit 5-10 Enzymeinheiten der entsprechenden Restriktionsenzyme im geeigneten Reaktionspuffer bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationsdauer richtete sich dabei nach den Angaben des Herstellers. Um das Ergebnis der Restriktion zu kontrollieren und die spezifische Zielsequenz aufzutrennen, erfolgte im Anschluss die Agarose-Gelelektrophorese.

#### 2.2.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die effektivste und einfachste Methode, DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen und zu identifizieren. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern in Anwesenheit eines elektrischen Feldes durch das Agarosegel, welches sich in einer Elektrophoresekammer mit ionischer Pufferlösung befindet, in Richtung der positiv geladenen Anode. Hierbei wandern kürzere Fragmente aufgrund der Scherkräfte und Viskosität des Gels schneller als lange. Um die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid hinzugegeben, das in den Doppelstrang interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. Für die DNA-Analyse nach sqPCR sowie Restriktion wurden 1-2 %ige Agarosegele und 50 x TAE Puffer angesetzt:

Agarosegel 1 %:	1 g Agarose ad. 100 ml 1 x TAE-Puffer
50 x TAE Puffer (pH 8,0):	242,8 g Tris (2 M) 100 ml EDTA (0,5 M) 57,1 ml Essigsäure ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O

Nachdem die Agarose in der Mikrowelle erhitzt und gelöst worden war, wurden 3 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugeben und das Gel in die mit Kämmen versehene Gelelektrophoresekammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden je 4 µl 6x loading Dye (Fermentas) zu den DNA-Proben gegeben und das Gemisch wurde danach in die Geltaschen gefüllt. Zusätzlich wurden 6 µl Shortfragment-Marker (GeneRuler, Fermentas) aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei etwa 100-120 V für 20-40 min.

#### 2.2.5.3 Elution von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel



Mit einem sterilen Skalpell wurde das zu eluierende DNA-Fragment aus dem Agarosegel (0,8 %-1 % w/v) ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml) überführt. Die anschließende DNA-Extraktion erfolgte mit dem QUIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

### 2.2.5.4 Ligation

Nach DNA-Restriktion konnte das herausgeschnittene spezifische DNA-Fragment mittels Ligation in einen Vektor eingeschleust werden. Hierbei erfolgte die Ligation von DNA-Fragmenten mit glatten Enden in einem molaren Verhältnis 1:5 von Vektor (linearisierte Plasmid-DNA) zu Fragment; bei Ligationen von überhängenden Enden in einem Verhältnis von 1:3. Zu der DNA wurden eine Enzymeinheit T4-DNA-Ligase (Fermentas, St. Leon-Rot), der zugehörige Puffer sowie ddH<sub>2</sub>O bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl hinzugegeben. Anschließend wurde der Ansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert. Für die nachfolgende Transformation wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes verwendet.

### 2.2.5.5 Transformation von stbI3 E.coli durch Elektroporation

Bei der Transformation wird das DNA-Plasmid, welches die inserierte Zielsequenz nach Ligation trägt, in kompetente Bakterien eingeschleust. Die rekombinante DNA kann nun durch den Wachstums- und Teilungszyklus des Bakteriums vervielfältigt werden. Eine Möglichkeit, die Bakterien für kurze Zeit durchgängig bzw. transformationskompetent zu machen, stellt die Elektroporation dar. 40 µl der elektro-kompetenten stbI3 E.coli-Bakterien wurden nach dem Auftauen auf Eis 2-5 µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA beigemischt, dann wurde das Gemisch in eine eisgekühlte 0,1-cm-Elektroporationsküvette (Bio-Rad, München) pipettiert und bei 1,8 kV im Gene Pulser (Bio-Rad) elektroporiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in 500 µl SOC-Medium resuspendiert und 30-60 min bei 30 °C im Bakterienschüttler (250 UpM) inkubiert. Zum Abschluss wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agar-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht im Bakterieninkubator bei 30 °C bebrütet.

LB-Medium:            10 g Pepton  
                             5 g Hefeextrakt  
                             170 mM NaCl  
                             ad 1 l ddH<sub>2</sub>O  
                             pH 7,5 (autoklaviert)

LB-Agar:	1 L LB-Medium 15 g Bactoagar 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin
SOC-Medium:	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 20 mM Glucose

#### 2.2.5.6 Transformation von stbl3 E.coli durch Hitzeschock

Eine weitere Möglichkeit Bakterien transformationskompetent zu machen, bietet der Hitzeschock. Nach dem Auftauen chemisch-kompetenter stbl3 E.coli-Bakterien (CaCl<sub>2</sub>) auf Eis wurde diesen ebenfalls 2-5 µl des Ligationsansatzes oder Plasmid-DNA beigemischt und das Gemisch wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte im Anschluss für exakt 30 sek bei 42 °C. Danach wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis gekühlt und in den weiteren Schritten wie oben bereits beschrieben verfahren.

#### 2.2.5.7 Bakterien-Glycerin-Stocks

Um die Transformanten und Bakterienstämme dauerhaft lagern zu können, wurden Glycerinkulturen angefertigt. Dazu wurden von der über Nacht in LB-Medium unter den entsprechenden Selektionsbedingungen gewachsenen Bakterienkultur 500 µl in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert, dieses wurde mit 500 µl einer sterilen 50 %igen Glycerinlösung versetzt und nach guter Durchmischung bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.5.8 Mini-Plasmidpräparation

Die Mini-Plasmidpräparation dient der Isolierung kleiner Plasmid-DNA Mengen (bis 25 µg) aus Bakterien. Dazu wurde am Vortag 5 ml steriles LB-Medium (mit 100 µg Ampicillin oder Kanamycin) mit der selektierten E.coli-Kolonie durch eine autoklavierte Pipettenspitze angeimpft und im Schüttler über Nacht bei 37 °C und 225 UpM inkubiert. Durch Zentrifugation (1200 x g, 3 min, 4 °C) wurden 2 ml dieser Bakterienkultur sedimentiert und dann mit 300 µl S1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl S2- Puffer und fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte im Anschluss die alkalische Lyse

der Bakterien. Danach wurden 300 µl gekühlter S3-Puffer hinzugegeben, das Lysat gut resuspendiert und für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (12000 x g, 15 min, 4 °C) und Überführung in ein neues Reaktionsgefäß wurde die Plasmid-DNA mit der Zugabe von 630 µl Isopropanol präzipitiert und bei weiterer Zentrifugation mit 12000 x g für 30 min bei 4 °C sedimentiert. Mit 70 %igem Ethanol wurde das DNA-Pellet bei 12000 x g und 4 °C gewaschen und dann im Tischinkubator bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurde die erhaltene Plasmid-DNA in 30 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und durch Restriktionsanalysen erneut überprüft.

S1-Puffer:            50 mM Tris/HCl pH 8,0  
                         10 mM EDTA  
                         100 µg/ml RNase A

S2-Puffer:            200 mM NaOH  
                         1 % (w/v) SDS

S3-Puffer:            2,6 M CH<sub>3</sub>COOK pH 7,2

#### 2.2.5.9 Maxi-Plasmidpräparation

Um eine größere Menge Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurde die Maxi-Plasmidpräparation (bis 0,5 mg) mittels Nucleo-Bond Kit (Macherey-Nagel, Düren) durchgeführt. Unter entsprechenden Selektionsbedingungen wurde die E.coli-Kultur in 80 ml LB-Medium über Nacht im Schüttler bei 37 °C angezogen. Der Bakterienansatz wurde zuerst für 10 min bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Bakterienpellet wurde in 12 ml S1-Puffer resuspendiert, nach weiterer Zugabe von 12 ml S2-Puffer gut durchmischt und für 5 min bei RT inkubiert. Dann wurde S3-Puffer hinzugegeben und erneut gemischt. Parallel wurde eine Nucleo-Bond AX500 (Maxi) Säule mit 6 ml N2-Puffer equilibriert, um im Anschluss das Bakterienlysate durch einen aufgesetzten Faltenfilter laufen zu lassen. Dabei wurde die Säule zweimal mit 15 ml N3-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 10 ml N5-Puffer in ein 50-ml-Falcon-Röhrchen eluiert. Mit 7 ml Isopropanol wurde die gereinigte Plasmid-DNA präzipitiert und bei 6000 x g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde mit 5 ml 70 %igem Ethanol bei 6000 x g für 5 min bei 4 °C gewaschen, bei 37 °C getrocknet und zum Schluss in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.2.5.10 DNA- & RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäure-Konzentration der Proben wurde mittels NanoDrop-Spektralphotometer bestimmt. Hierbei wurde die OD von je 1,5 µl

Probenvolumen bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei die OD von destilliertem Wasser als Referenz diente. Eine OD von 1 bei 260 nm entspricht ungefähr einem DNA-Gehalt von 50 µg/ml bzw. einem RNA- Gehalt von 40 µg/ml. Da Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, kann durch das Verhältnis OD260/OD280 die Reinheit der Nukleinsäuren ermittelt werden. RNA-Präparationen mit einem Quotient von 1,7-2,0 und DNA-Proben mit einem Quotient von 1,6-2,0 können als rein eingestuft werden.


#### 2.2.5.11 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (sqPCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische Zielsequenzen der DNA mit Hilfe thermostabiler Taq-Polymerase unter Anwesenheit von Nukleotiden, Primern und einem geeigneten Puffer millionenfach amplifiziert, sodass die geringe Ausgangs-DNA-Menge einer Analyse schnell und einfach zugänglich gemacht wird. Die PCR läuft in einem Zyklus ab, der sich in drei Schritte gliedert: 1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA; 2. Annealing der Primer und 3. Elongation des 3'-5'-Stranges. Dabei gilt es, die Schmelztemperatur der Primer zu beachten und die Zyklenanzahl vorher festzulegen. Die notwendigen Reagenzien wurden mit Ausnahme der cDNA und den Primern (Metabion) vom peqGold PCR Hot Start Mix Y MM PCR Kit (Peqlab, Erlangen) bezogen. Der typische Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

PCR-Hot Start Master Mix	10,00 µl
SE-Primer (10 µM)	0,60 µl
AS-Primer (10 µM)	0,60 µl
cDNA	1,00 µl
ddH <sub>2</sub> O	7,80 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,00 µl</b>

Für eine Standard-PCR wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	5 min	
2	95 °C	30 sek	
3	Tm-3 °C	30 sek	
4	72 °C	45 sek	
5	72 °C	7 min	
6	4 °C	∞	



25-35  
Zyklen

## 2.2.5.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten nach Restriktion oder PCR

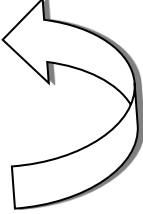
DNA-Fragmente, die mit PCR amplifiziert oder durch Restriktion erhalten worden waren, wurden mit dem Rapid PCR Purification Kit (Marligen Biosciences, Ijamsville, USA) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die gereinigte DNA konnte so direkt für die Ligation oder Transfektion verwendet werden.

2.2.5.13 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die quantitative *real-time* PCR stellt eine gängige und moderne Methode dar, PCR-Produkte zu quantifizieren. Dies wird durch den fluoreszierenden Farbstoff SYBR Green ermöglicht, der während des Amplifizierungsprozesses in die DNA interkaliert. Proportional zur Menge der amplifizierten PCR-Produkte nimmt die Fluoreszenz zu, die parallel über ein Fluoreszenz-Detektionsgerät gemessen wird. Für die qRT-PCR wurde der iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, München) verwendet, wobei von jeder Probe Triplikate angesetzt wurden. Ein typischer Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

2x SYBR Green Master Mix	10,00 µl
SE-Primer (10 µM)	0,30 µl
AS-Primer (10 µM)	0,30 µl
Template	1,00 µl
ddH <sub>2</sub> O	8,40 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,00 µl</b>

Die qRT-PCR wurde mit dem DNA Engine OPTICON®2 Thermozykler (MJ Research Inc, Waltham, USA) wie folgt durchgeführt:


Schritt	Temperatur	Zeit	 45 Zyklen
1	95 °C	3 min	
2	95 °C	10 sek	
3	Tm-3 °C	45 sek	
4	72 °C	30 sek	
5	72 °C	5 min	
6	4 °C	∞	

#### 2.2.5.14 TaqMan® quantitative *real-time* PCR

Die TaqMan® qRT-PCR stellt eine gängige und effiziente Methode dar, kurzsträngige cDNA-Template wie von miRs zu quantifizieren. Sie basiert ebenfalls auf dem Fluoreszenzprinzip. Nachdem die miR mittels RT in cDNA umgeschrieben worden war, wurde ein Probenansatz, jeweils in Triplikaten, wie folgt angesetzt:

TaqMan® Universal PCR Master II Mix	10,00 µl
(2 x), no UNG	
Taq Man small RNA assay Primer	1,00 µl
(20 x)	
cDNA Probe	1,00 µl
Nuklease freies Wasser	8,00 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,00 µl</b>

Die Versuchsansätze wurden auf eine 96-0,1mM-*fast-well*-Platte überführt und die qRT-PCR mit Hilfe des TaqMan® Thermozyklers sowie SDS2.3 Programms wie folgt durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
1	95 °C	15 sek	 45 Zyklen
2	60 °C	60 sek	

Die quantifizierten Expressionslevel wurden mit Hilfe des Programms RQ Manager 2.3 (Applied Biosystems) sowie DataAssist v3.01 ausgewertet und mit der endogenen RNU6B Kontrolle normalisiert.

#### 2.2.6 Protein-Arbeitstechniken

##### 2.2.6.1 Proteinextraktion aus Zelllysät

Um die intrazelluläre Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien zu untersuchen, wurde zuerst der Proteinanteil aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst. Im Anschluss wurden die Zellsuspension für 4 min bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert, das gewonnene Zellpellet mit 5 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wurde das Pellet je nach Größe mit 50-150 µl Lysepuffer (mit 1/10 Volumen Protease-inhibitoren) resuspendiert, in ein 1,5-ml-Eppendorfgefäß pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert.

Abschließend wurde das Lysat für 15 min zentrifugiert (13000 x g, 4 °C) und der proteinenthaltende Zellüberstand in ein neues 1,5 µl Eppendorfgefäß überführt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -20 °C.

RIPA-Puffer:	5 ml Tris (1 M, pH 7,2) 3 ml NaCl (5 M) 0,5 ml SDS (20 %) 1 g Na-deoxycholat 1 ml Triton X-100 ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O steril filtriert und bei 4 °C gelagert
Lysepuffer-Mastermix:	RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren im Verhältnis 10: 1
Protease-Inhibitoren:	10 x 10 mM SOV (pH 9,0) 10 x Protease-Phosphatase-Inhibitor (Roche, Mannheim) 20 x 1 M NaF

### 2.2.6.2 Bestimmung der Protein-Konzentration

Mittels Bradford-Analyse (Bio-Rad, München) wurde die Protein-Konzentration des Zelllysats bestimmt, indem über photometrische Messung auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes, die Extinktion des blauen Protein-Farbstoff Serva-Blue-G-Komplexes ermittelt wurde. Mit dem angesetzten Bradford-Reagenz wurde zuerst 1 µl der Proteinprobe verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Für jede Probe wurden Doppelansätze sowie ein Leerwert zum Nullabgleich angesetzt. Nach sorgfältigem Vortexen der Proben wurde die OD bei 595 nm im Eppendorf Biophotometer (Hamburg) gemessen und die Konzentration durch eine BSA-Eichkurve bestimmt.

Verdünntes Bradford-Reagenz:	200 µl Bradford-Reagenz 99 µl PBS 700 µl ddH <sub>2</sub> O
------------------------------	---

### 2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die anschließende Proteinauftrennung wurde mittels Elektrophorese in einem diskontinuierlichen auf Polyacrylamid basierenden Gel erreicht (SDS-PAGE). Bei diesem Verfahren lagert sich das anionische Tensid SDS (Natriumdodecylsulfat) an die vorher denaturierten Proteine und überdeckt dabei deren positive Eigenladung.

Unter Anwesenheit eines elektrischen Feldes und SDS-Laufpuffers wandern die konstant negativ geladenen Proteinketten im Zweiphasen-SDS-Polyacrylamidgel in Richtung Anode. Dabei werden die Proteine im Sammelgel (erste Phase) aufkonzentriert und im Trenngel (zweite Phase) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Mit einer Menge von 50-100 µg wurden die Proteinproben zuerst mit 4 µl 10x DTT, 8 µl 5x *loading Dye* (Thermo Scientific) und ddH<sub>2</sub>O auf 40 µl Volumen gemischt, im Heizblock für 7 min bei 95 °C denaturiert, gevortext und auf ein 10 % polyacrylamidhaltiges Gel geladen. Als Größenstandard mit 10-170 kDa diente der *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Die anschließende SDS-PAGE fand im Mini-Protean-3-System (Bio-Rad, München) in 1x SDS-Laufpuffer für 2 Stunden bei 60 V im Sammelgel und 80-100 V im Trenngel statt.

Sammelgelpuffer (pH 6,8):	60,55 g Tris (0,5 M) ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O
Trenngelpuffer (pH 8,8):	181,65 g Tris (1,5 M) ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O
Sammelgel:	6,4 ml ddH <sub>2</sub> O 2,5 ml Sammelgelpuffer 1,0 ml Acrylamid (40 %) 100 µl SDS (10 %) 17 µl Ammoniumpersulfat (30 %) 11 µl TEMED
Trenngel (10 %):	4,9 ml ddH <sub>2</sub> O 2,5 ml Trenngelpuffer 2,5 ml Acrylamid (40 %) 100 µl SDS (10 %) 17 µl Ammoniumpersulfat (30 %) 6 µl TEMED



10 x SDS-Laufpuffer:	30 g Tris
	144 g Glycin
	10 g SDS (Pellets)
	ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O

#### 2.2.6.4 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL, Amersham, Freiburg) transferiert, um diese im Anschluss mittels Immunodetektion sichtbar zu machen. Hier wurde das *semi-dry-blotting* Verfahren mittels Trans Blot SD-Zelle (Bio-Rad, München) angewandt. Das SDS-PAGE-Gel sowie Nitrozellulosemembran und Whatman-Filterpapiere (VWR) wurden dafür zuerst in 1 x Transferpuffer für etwa 15 min äquilibriert. Die Blotapparatur wurde danach in Sandwichtechnik: Schwamm, Filterpapier, Membran, Gel, Filterpapier sowie Schwamm luftblasenfrei zusammengelegt und in die mit 1 x Blottingpuffer gefüllte Kammer zusammen mit einem Kühlpack und einem Rührfisch gesteckt. Der Proteintransfer fand schließlich auf einem Magnetrührer bei einer konstanten Stromstärke von 100 V für eine Stunde und bei 4 °C statt. Um den Transfer zu überprüfen und die Membran mit einem sterilen Skalpell in mehrere Teile zu schneiden, damit gleichzeitig mehrere Proteine zu detektieren, wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Ponceau S-Lösung kurz angefärbt.

1 x Blottingpuffer:	5,82 g Tris
	2,93 g Glycin
	200 ml Methanol
	ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O
Ponceau S-Lösung:	1 g Ponceau S
	50 ml Essigsäure
	ad. 1 L ddH <sub>2</sub> O
5 x Milchlösung:	5 %iges Milchpulver
	1 x TBST

#### 2.2.6.5 Immunodetektion

Mittels Immundetektion werden die auf der Nitrozellulosemembran-fixierten Proteine durch Antikörper-Antigen Reaktion und Chemolumineszenz für das menschliche Auge sichtbar gemacht. Dabei bindet zuerst ein spezifischer Primärantikörper an das Antigen des Proteins. Ein zweiter unspezifischer Antikörper, der an eine Meerrettichperoxidase (HRP-*horseradish*-Peroxidase) konjugiert ist, erkennt und reagiert mit dem konstanten Bereich des Primärantikörpers. Durch die Reaktion von HRP und luminolhaltigem Substrat kommt es zur Chemolumineszenz und der Visualisierung der Proteinbanden. Als erstes wurde die Nitrozellulosemembran in 5 %iger Milchlösung für eine halbe Stunde auf dem Schüttler bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu reduzieren. Danach wurde die Membran mit dem in 5 %iger Blockiermilch im Verhältnis von 1:1000 gelösten Primärantikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Dem folgten drei zehnminütige Waschschrte mit 1 x TBST und anschließend die Inkubation mit dem in 5 %iger Blockiermilch im Verhältnis von 1:4000 gelösten Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT auf dem Schüttler. Die Membran wurde danach erneut für zehn Minuten zweimal mit 1 x TBST und einmal mit 1 x TBS gewaschen. Die Chemolumineszenzreaktion des Sekundärantikörpers erfolgte unter Verwendung des ECL Plus Western Blotting Detection Kits (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Mit einem Chemolumineszenzfilm (Amersham, Hyperfilm™ ECL, Freiburg) wurden die Proteinbanden auf der Membran detektiert und im Curix 60 (AGFA Health Care, Deutschland) entwickelt. Sofern das mit ECL detektierte Signal aufgrund geringer Proteinmenge zu schwach war, wurde stattdessen das chemolumineszenzsensitivere SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate Kit (Pierce) oder SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben verwendet.

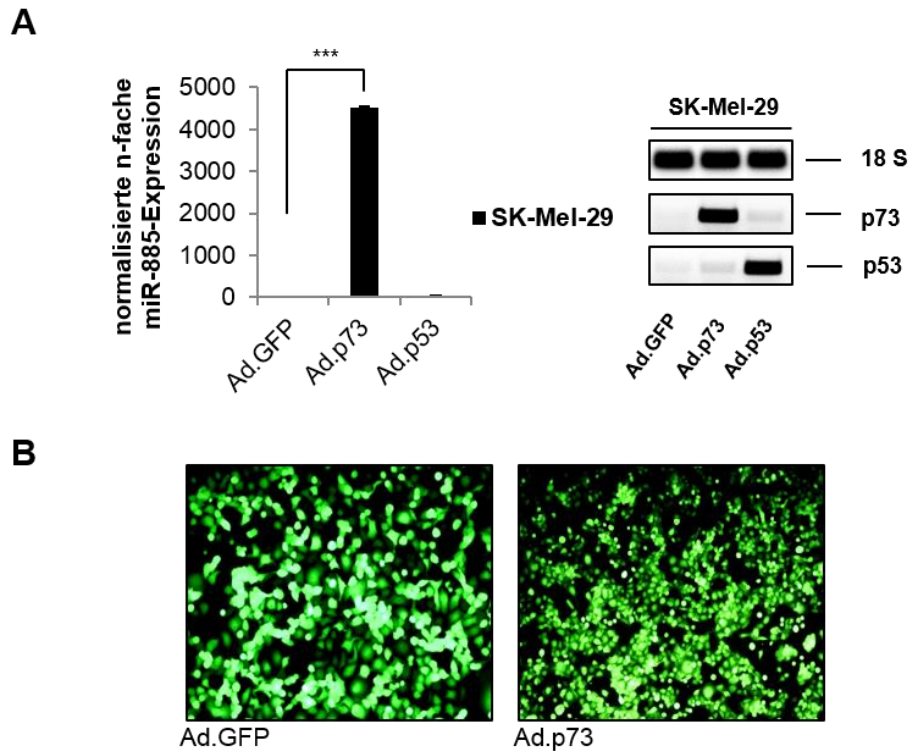
5 x Milchlösung:	5 %iges Milchpulver 1 x TBST
1 x TBST-Puffer:	100 ml TBS (10x) 900 ml ddH <sub>2</sub> O 1 ml Tween 20
10 x TBS-Puffer:	24,2 g Tris 80 g NaCl pH 7,6

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Regulation der miR-885-Expression durch p73 und seine N-terminal verkürzte-Isoform p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$

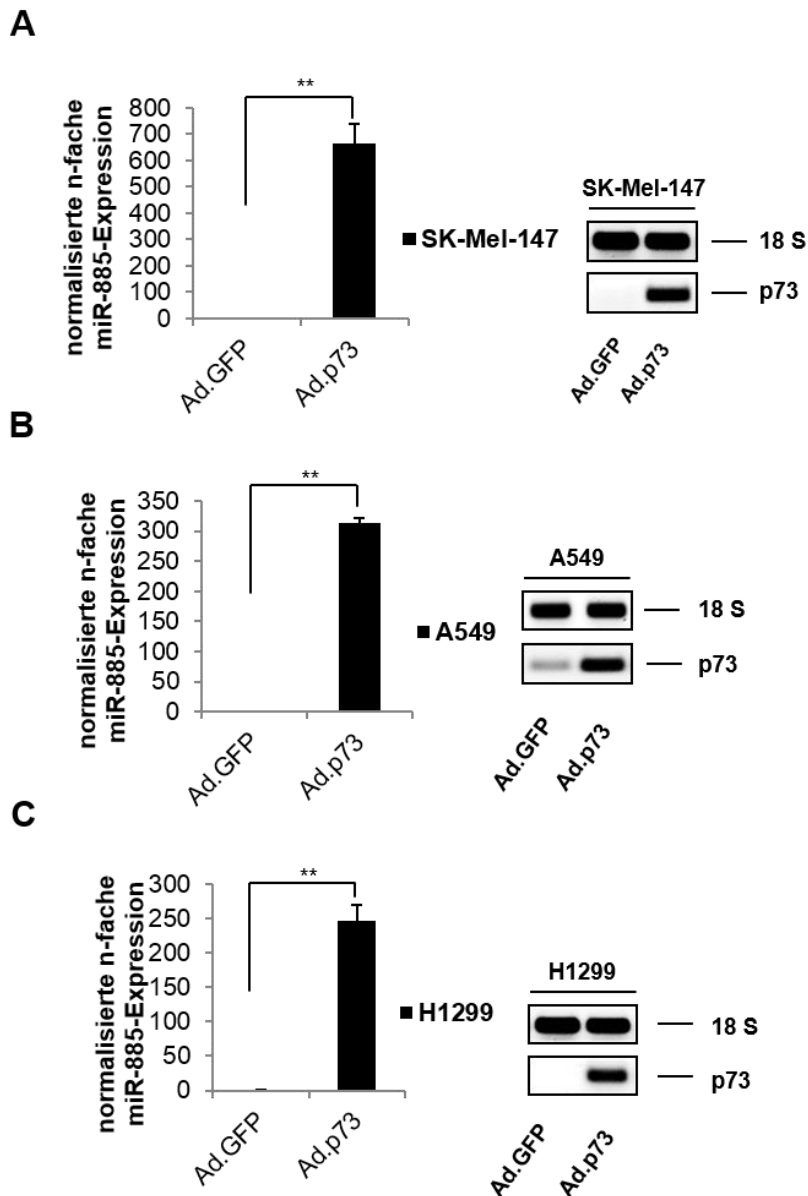
##### 3.1.1 Der Tumorsuppressor p73 aktiviert die miR-885-Expression

Um die Ergebnisse des vorausgegangenen *TaqMan®-MicroArray*-Analysen zu verifizieren und den Einfluss von p73 und seiner N-terminal verkürzten Isoform auf die Expression der miR-885-Isoform miR-885-5p (im Folgenden als miR-885 bezeichnet) zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen unter transienter adenoviral-vermittelter p73-Überexpression durchgeführt. Zu Beginn wurden die auch im miR-Array verwendeten nicht metastasierenden SK-Mel-29-Melanomzellen mit Ad.p73 und Ad.GFP infiziert. Dabei diente der das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimierende Vektor als zusätzliche positive Transduktionskontrolle. Nach 48-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert, wobei sie gleichzeitig in *Large*-RNA (L) (Gesamt) und *Small*-RNA (miR) aufgetrennt und schließlich durch Reverse-Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Der Transduktionserfolg und die damit zu erwartende intrazelluläre Expression von p73 wurde durch sqPCR der L cDNA kontrolliert. Zur Gewährleistung vergleichbarer cDNA-Mengen bzw. als interne Kontrolle wurde gleichzeitig das ribosomale 18S-Gen (*housekeeping gene*) amplifiziert. Die miR-885-Expressionsraten wurden mittels quantitativer TaqMan® *real-time* PCR und spezifischen miR-885-5p-Primern (Applied Biosystems®, Darmstadt) bestimmt. Dabei zeigte sich unter p73-Überexpression in SK-Mel-29-Zellen eine deutliche Induktion der endogenen miR-885-Level, welche im Vergleich zur GFP-Kontrolle um mehr als das 4000-fache erhöht war (Abb. 5). Im Gegensatz dazu führte die transiente Überexpression von p53 zu keiner signifikanten Veränderung der miR-885-Expression.



**Abb. 5: Induktion der miR-885-Expression in SK-Mel-29 nach p73-Überexpression. (A) (links)** Signifikanter Anstieg der endogenen miR-885-Expression in SK-Mel-29 transduziert mit Ad.p73 (\*\*p < 0,01). **(rechts)** Kontrolle der p73- und p53-Überexpression durch sqPCR. Das ribosomale S18-Gen diente als interne Ladungskontrolle. **(B)** Mikroskopischer Nachweis der GFP-Expression in SK-Mel-29-Zellen 48 Stunden nach adenoviraler Transduktion.

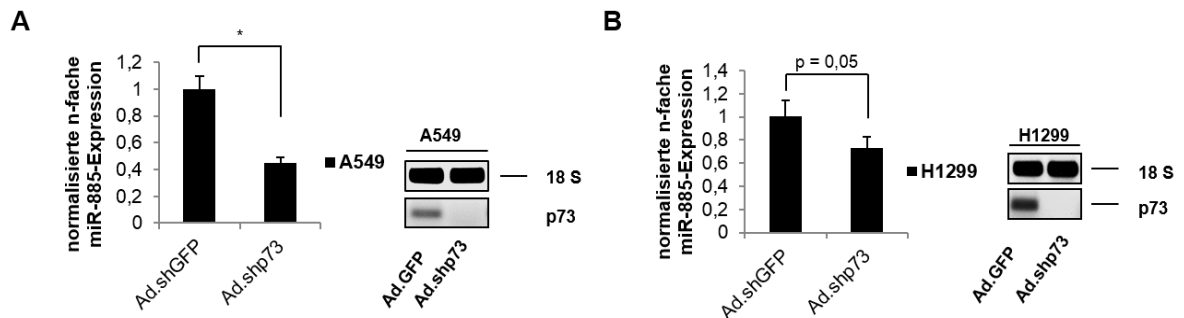
Sowohl in der hoch-invasiven/metastasierenden Melanomzelllinie SK-Mel-147 als auch in den Lungenkrebszelllinien A549 und H1299 wurde ein deutlicher (>250-facher) Anstieg der miR-885-Expression unter forcierter p73-Expression beobachtet (Abb. 6). Das Ergebnis bestätigt die zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten *Array*-Analysen und unterstützt die Annahme, dass es sich beim Tumorsuppressor p73 um einen Schlüsselregulator von miR-885 handelt.



**Abb. 6: Induktion der miR-885-Expression nach p73-Überexpression in (A) SK-Mel-147, (B) A549 und (C) H1299. (links)** Signifikanter Anstieg nach Transduktion mit Ad.p73 (\*\*p < 0,01). **(rechts)** Transduktionskontrolle durch sqPCR.

Die im Anschluss durchgeführte Depletion von endogenem p73 wurde mittels adenoviraler Transduktion einer gegen p73-gerichteten shRNA durchgeführt. Zur Bestimmung unspezifischer Virus-bedingter Einflüsse auf die Ziel-Transkripte diente Ad.shGFP als Negativkontrolle, welches eine gegen GFP-gerichtete shRNA exprimiert (Stanelle et al., 2005). Für den *Knock-down* wurden A549- und H1299-Zellen mit dem jeweiligen Ad.Virus infiziert und die miR-885-Expression nach 48-stündiger Inkubation

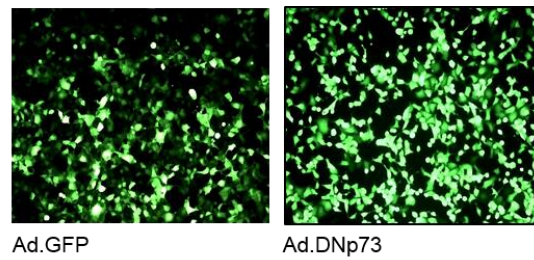
gemessen. In beiden Lungenkrebszelllinien zeigte sich nach p73-Verlust ein signifikanter Rückgang der miR-885-Expression (Abb. 7). Schlussfolgernd unterstützt die aufgetretene Repression von miR-885 unter p73-Depletion die Hypothese einer Regulation von miR-885 durch p73.



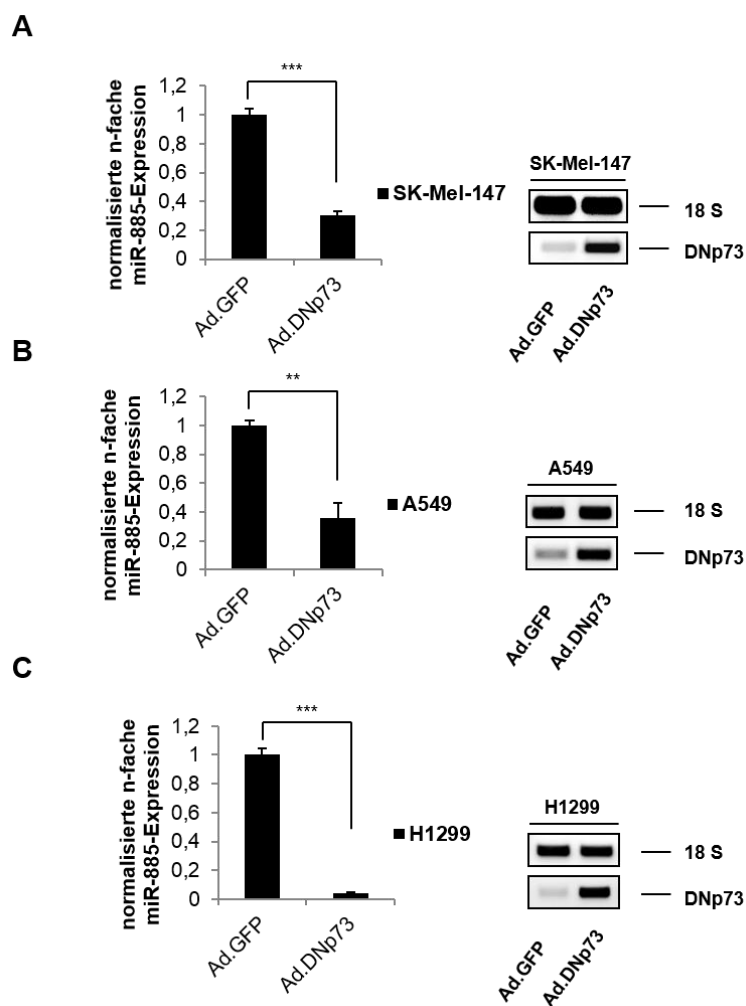
**Abb. 7: Repression der miR-885-Expression nach p73-Knock-down in (A) A549 und (B) H1299. (links)** Signifikante Reduktion der endogenen miR-885-Expression nach Transduktion mit Ad.shp73 in A549 und H1299 (\* $p < 0,05$ ). **(rechts)** Kontrolle des p73-Knock-downs mittels sqPCR.

### 3.1.2 Einfluss der onkogenen p73-Isoform DNp73 auf die p73-induzierte miR-885-Expression

Aufgrund der dominant-negativen Funktion der N-terminal verkürzten p73-Isoformen (Stiewe et al., 2002) sollte der Effekt von DNp73 auf die p73-vermittelte miR-885-Expression analysiert werden. Dafür wurden SK-Mel-147, A549 und H1299 mit einem adenoviralen Vektor, welcher speziell die p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$ -Variante (im Folgenden als DNp73 bezeichnet) nach Transduktion intrazellulär überexprimiert, infiziert und anschließend wie in 3.1.1 beschrieben verfahren (Abb. 8). Die nachgewiesenen miR-885-Expressionslevel weisen unter DNp73-Überexpression eine deutliche Reduktion auf (Abb. 9), wobei sie in SK-Mel-147 und A549 um mehr als 60 % und in H1299 um 90 % im Vergleich zur Kontrolle abnehmen. Die Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es unter hohen DNp73-Leveln zu einer Inaktivierung von p73 kommt und die Expression von miR-885 dadurch deutlich abgeschwächt wird.



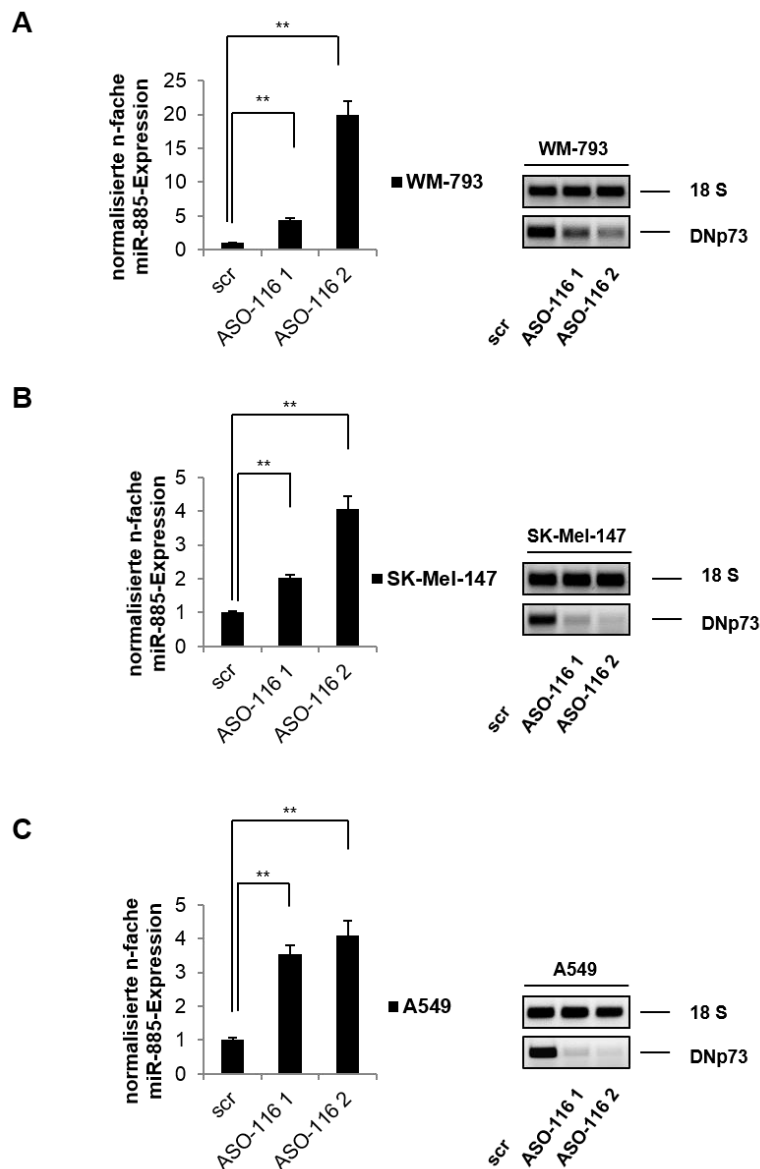
**Abb. 8: GFP-Nachweis 48 Stunden nach Ad.DNp73-Transduktion in H1299-Zellen.** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Ad.DNp73 und Ad.GFP als Kontrolle.



**Abb. 9: Repression der miR-885-Expression nach DNp73-Überexpression in (A) SK-Mel-147, (B) A549 und (C) H1299.** (links) Signifikante Reduktion der endogenen miR-885-Expression in SK-Mel-147, A549 und H1299 nach Transduktion mit Ad.DNp73 (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). (rechts) Transduktionskontrolle mittels sqPCR.

Anschließend wurde das Verhalten der miR-885 nach spezifischem *Knock-down* von DNp73 in aggressiveren Tumorzellen mit hohem endogenen DNp73-Anteil wie SK-Mel-147, WM-793 und A549 (Uramoto et al., 2006; Steder et al., 2013) analysiert. Als DNp73-Inhibitor wurde dabei, aufgrund seiner Spezifität gegen die amino-trunkierte Isoform  $\Delta\text{Ex}2/3\text{p}73$  (Emmrich et al., 2009), das *Anti-sense* Oligonukleotid ASO-116 verwendet. Zuerst wurden die Zellen mit 125 nM (1) und 250 nM (2) ASO-116 (BioTeZ GmbH, Berlin), bzw. 250 nM ASO scr (BioTeZ GmbH, Berlin) als Kontrolle transfiziert und für 48 Stunden inkubiert. Nach LRNA und miR-Isolierung wurde der Effekt von ASO-116 auf DNp73 durch sqPCR kontrolliert und die endogenen miR-885-Level durch quantitative TaqMan® *real-time* PCR bestimmt. Die Ergebnisse zeigten einen 20-fachen Anstieg von miR-885 in WM-793-Zellen und 4-fache Zunahme von miR-885 in SK-Mel-147 und A549 nach DNp73-*Knock-down* im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 10). Die Induktion von miR-885 nach DNp73-Verlust weist vor dem Hintergrund einer funktionellen Inaktivierung des Wildtyp-Proteins durch DNp73 daraufhin, dass die Expression von miR-885 durch p73/DNp73 differentiell reguliert wird.

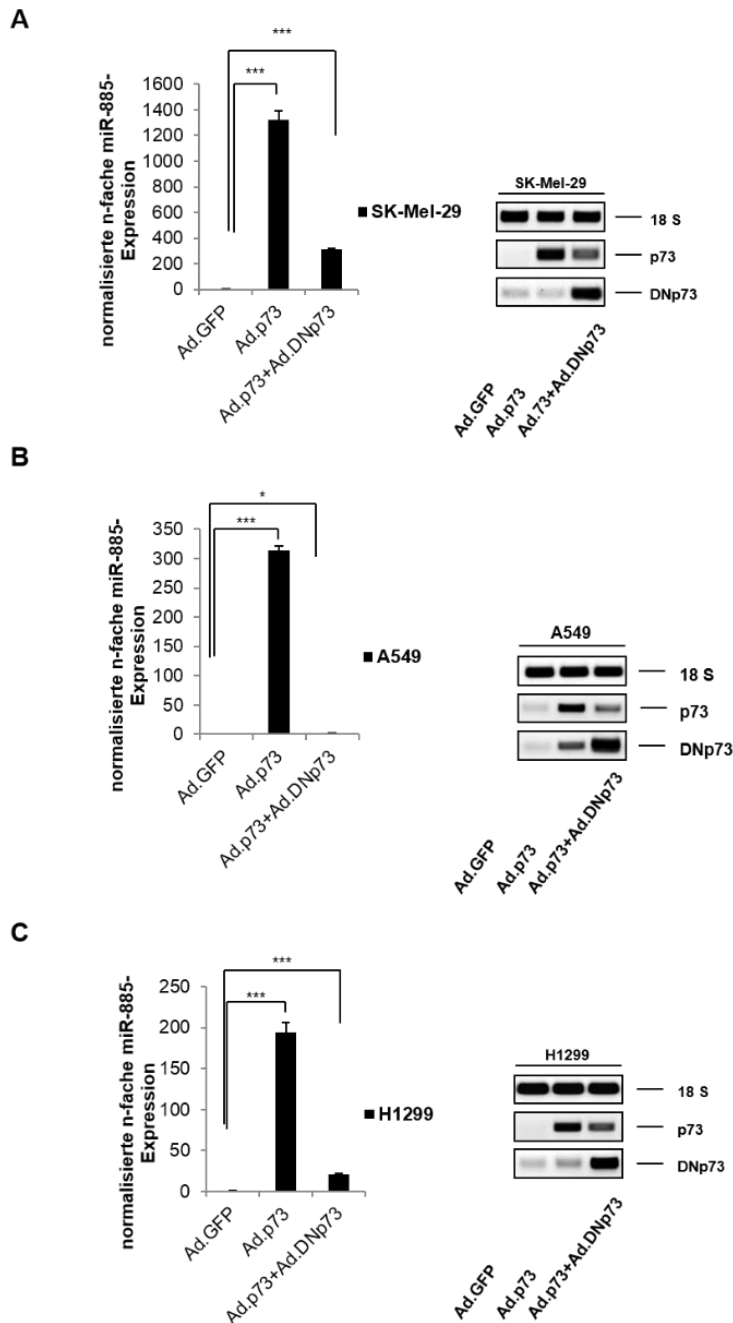




**Abb. 10: Induktion der miR-885-Expression nach ASO-116-vermitteltem DNp73-Knock-down in (A) WM-793, (B) SK-Mel-147 und (C) A549. (links) Konzentrationsabhängiger Anstieg der endogenen miR-885-Expression in ASO-116-transfizierten WM-793, SK-Mel-147 und A549 (\*\*p < 0,01). (rechts) Transfektionskontrolle mittels sqPCR.**

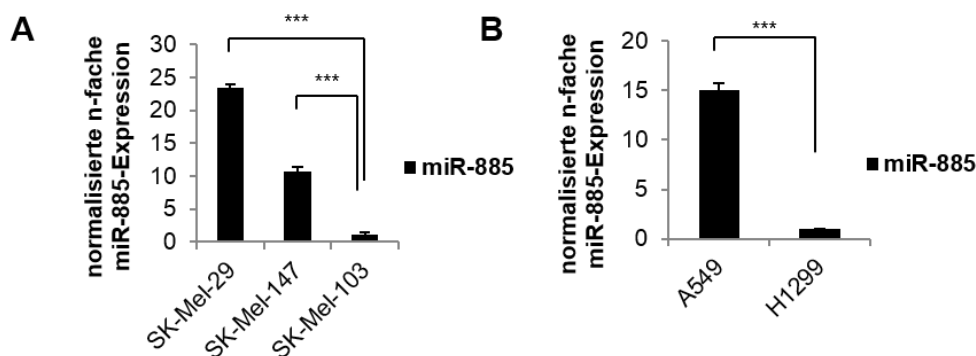
Da chemoresistente Tumorzellen neben erhöhten DNp73-Leveln auch eine hohe TAp73-Expression aufweisen, wurde die miR-885-Expression im Folgenden unter gleichzeitiger Gegenwart von DNp73 und p73 analysiert. Die adenovirale Kotransduktion von p73 und p73ΔEx2/3β wurde mit jeweils gleicher MOI (*Multiplicity of infection*) in SK-Mel-29, A549 und H1299 durchgeführt. Im Vergleich zur alleinigen p73-Überexpression führte die Koexpression von DNp73 zu einer deutlichen Reduktion

der p73-induzierten miR-885-Expression (Abb. 11). Schlussfolgernd wird deutlich, dass die p73-vermittelte Aktivierung von miR-885 durch ektope Expression von DNp73 aufgehoben wird.



**Abb. 11: Repression der miR-885-Expression nach gleichzeitiger Überexpression von p73 und DNp73 in (A) SK-Mel-29, (B) A549 und (C) H1299. (links)** Signifikante Reduktion der endogenen miR-885-Expression nach Kontransduktion mit Ad.p73 und Ad.DNp73 im Vergleich zur Transduktion mit Ad.p73 (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). **(rechts)** Transduktionskontrolle durch sqPCR.

Dieser inhibierende Effekt von DNp73 auf die miR-885-Expression konnte darüber hinaus mit der Bestimmung der endogenen miR-885-Expression in unterschiedlich aggressiven Melanom- und Lungenkrebszelllinien gezeigt werden. Im Vergleich zu der niedrig malignen Melanomzelllinie SK-Mel-29 mit bekanntlich geringen DNp73-Leveln (Tuve et al., 2004; Steder et al., 2013) weisen hoch-invasive/metastasierende Melanomzelllinien SK-Mel-147 und SK-Mel-103 mit höherem DNp73-Proteinanteil eine reduzierte miR-885-Expression auf (Abb. 12). Gleiches gilt für A549- und H1299-Zellen. Bezüglich der bisher unveröffentlichten Ergebnisse unserer Forschungsgruppe, die eine höhere DNp73-Expression in H1299- als A549-Zellen belegen, liegt in H1299-Zellen eine geringere miR-885-Expression vor.



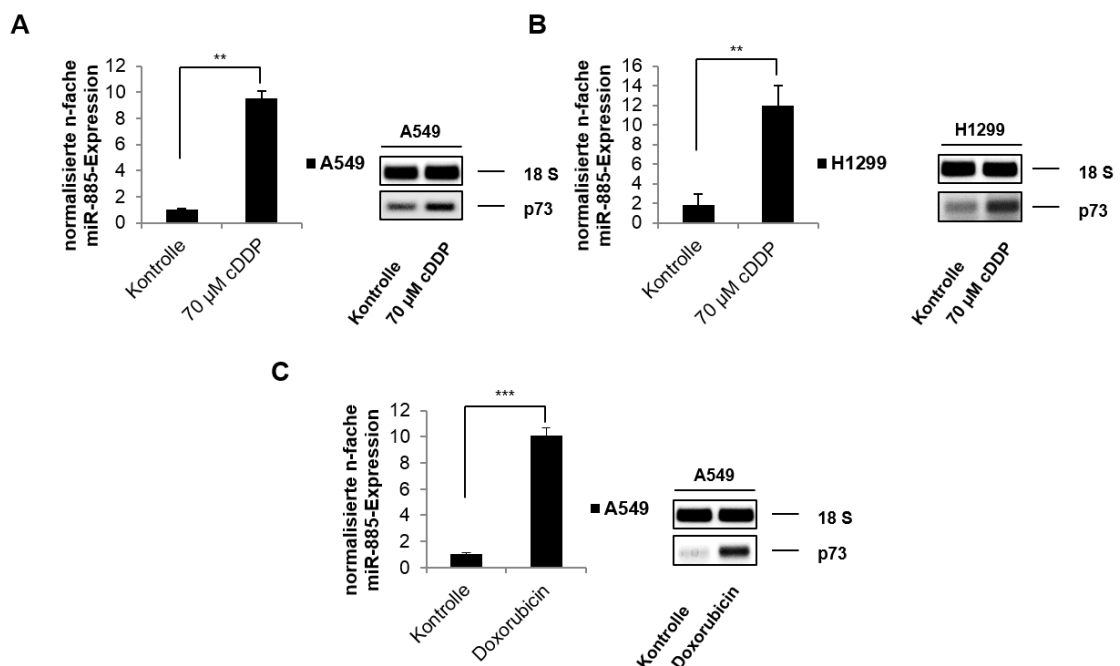
**Abb. 12 Bestimmung der endogenen miR-885-Expression in (A) SK-Mel-29, SK-Mel-147, SK-Mel-103, (B) A549 und H1299** Signifikant reduzierte miR-885-Level in aggressiven Melanom- und Lungenkrebszelllinien mit endogen hohem DNp73-Anteil (\*\*\*p < 0,001).

## 3.2 *In vitro*-Analysen unter Chemotherapeutika-Einfluss

### 3.2.1 Endogener miR-885-Anstieg unter Zytostatika-Behandlung

Es ist bekannt, dass durch gezieltes Auslösen von genotoxischem Stress, wie zum Beispiel durch Cisplatin- (cDDP) oder Doxorubicin-Gabe, eine intrazelluläre p73-Induktion hervorgerufen und Apoptose gefördert wird (Lunghi et al., 2009). Da die vorausgegangenen Experimente gezeigt haben, dass die Expression von miR-885 durch p73 reguliert wird, wurde anschließend die Wirkung von Chemotherapeutika hinsichtlich der Bedeutung der miR für die p73-induzierte Apoptose analysiert. Dazu wurden A549- und H1299-Zellen mit klinisch relevanten Konzentrationen (Zhang P Gao et al., 2003;

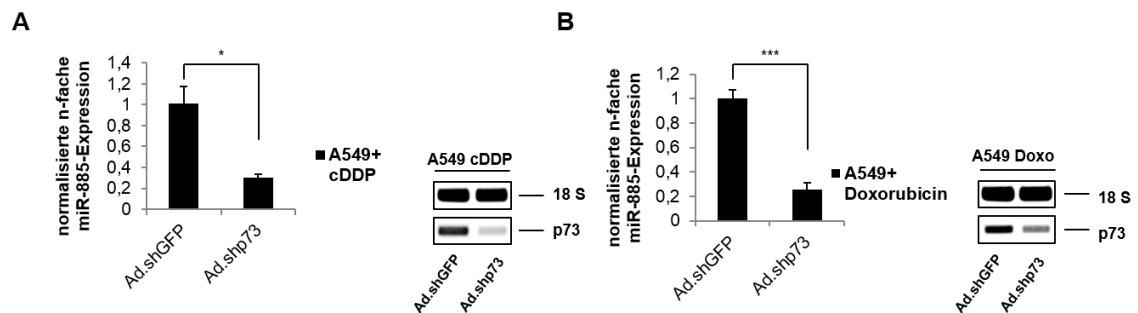
Kvardova et al., 2010; Lu C et al., 2012) von Cisplatin (cDDP, 70  $\mu$ M) und Doxorubicin (1  $\mu$ M) behandelt. Als Kontrolle diente zytostatikafreies Medium. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die endogene miR-885-Expression mittels quantitativer Taqman® *real-time* PCR bestimmt und die intrazelluläre p73-Induktion mittels sqPCR verifiziert. Sowohl in A549 als auch H1299 zeigte sich unter cDDP ein Anstieg der miR-885-Raten, welche bis um das 12-fache im Vergleich zur Kontrolle erhöht waren. Unter Anwesenheit von Doxorubicin stieg die miR-885-Expression in A549 ebenfalls signifikant an (Abb. 13).



**Abb. 13: Induktion der miR-885-Expression unter Chemotherapeutika-Behandlung in (A), (C) A549 und (B) H1299. (links)** Signifikanter Anstieg der endogenen miR-885-Expression nach 48 h in den Cisplatin-behandelten Lungenkrebszellen (\*\* $p < 0,01$ ) und den Doxorubicin-behandelten A549-Zellen (\*\* $p < 0,001$ ). **(rechts)** Nachweis der p73-Induktion durch sqPCR.

Im zweiten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit der Anstieg der Chemotherapeutika-induzierten-miR-885-Level durch p73 reguliert wird. Dazu wurde p73 durch eine spezifische shRNA inhibiert und endogenes miR-885 unter gleichzeitiger Cisplatin- und Doxorubicin-Behandlung bestimmt. A549-Zellen wurden mit Ad.shp73 (MOI 10) infiziert und 24 h später mit 70  $\mu$ M Cisplatin bzw. 1  $\mu$ M Doxorubicin behandelt. Die endogenen miR-885-Expressionslevel wurden mittels Taqman® *real-time* PCR

quantifiziert und der shp73-vermittelte p73-Knock-down auf RNA-Ebene durch sqPCR kontrolliert. In Ad.shp73-infizierten Zellen kam es sowohl unter Cisplatin- als auch unter Doxorubicin-Behandlung zu einer signifikanten Hemmung der miR-885-Expression (Abb. 14).

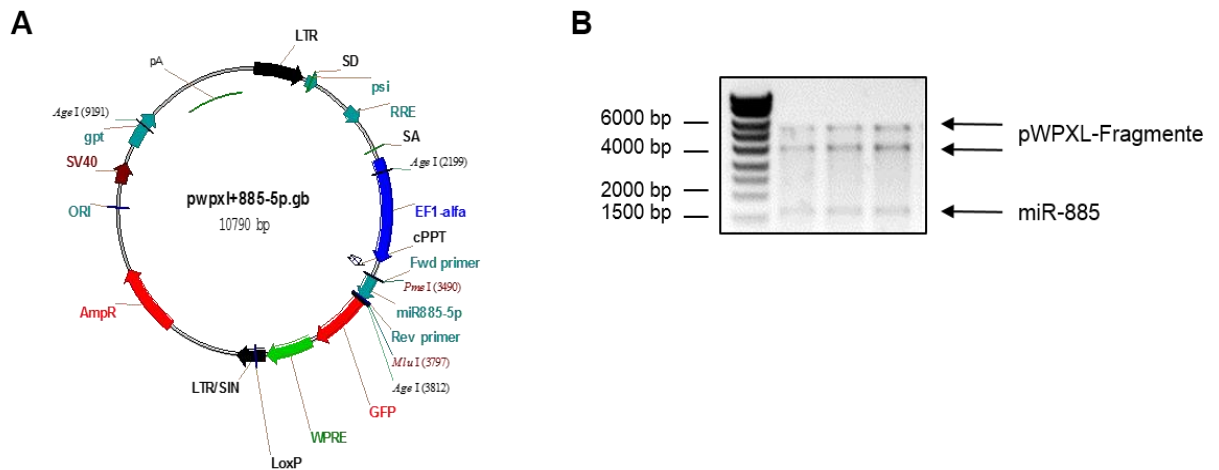


**Abb. 14: Repression der miR-885-Expression nach p73-Knock-down in A549-Zellen (A) unter cDDP (70 µM) und (B) unter Doxorubicin (1 µM). (links)** Signifikante Reduktion der endogenen miR-885-Expression nach 24 h in A549 Ad.shp73 (\*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001) **(rechts)** Kontrolle des p73-Knock-downs durch sqPCR.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Expression von miR-885 durch Zytostatika und die damit einhergehende Induktion von p73 potenziert wird.

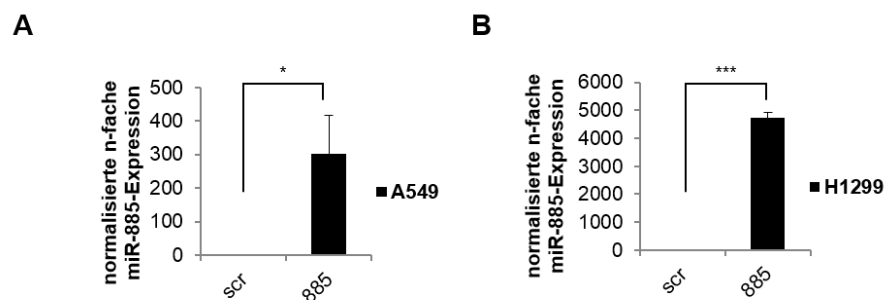
### 3.2.2 Stabile miR-885-Überexpression führt zur Chemosensibilisierung *in vitro*

Im Kontext einer sowohl nach Zytostatika-Gabe als auch durch p73-Überexpression nachweisbaren Induktion von miR-885 stellte sich die Frage, ob miR-885 einen Apoptose-stimulierenden Effekt besitzt. Der Einfluss von miR-885 auf das Ansprechen von Chemotherapeutika bzw. die Chemosensibilität der Tumorzellen wurde in stabil miR-885-überexprimierenden A549 und H1299 untersucht. Hierzu wurde das miR-885-Gen über die Restriktionsstellen *Pme*-I und *Mlu*-I in den Plasmidvektor pWPXL kloniert (Abb. 15). Zur Überprüfung der Klonierung wurde die DNA mittels *Age*-I Restriktionsverdau geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und sequenziert. Im Anschluss wurde pWPXL-miR-885 über ein Lentivirus stabil in das Genom der Zellen eingeschleust. Der Leervektor pWPXL-scr, der keine spezifische miR exprimiert, diente als Kontrolle.



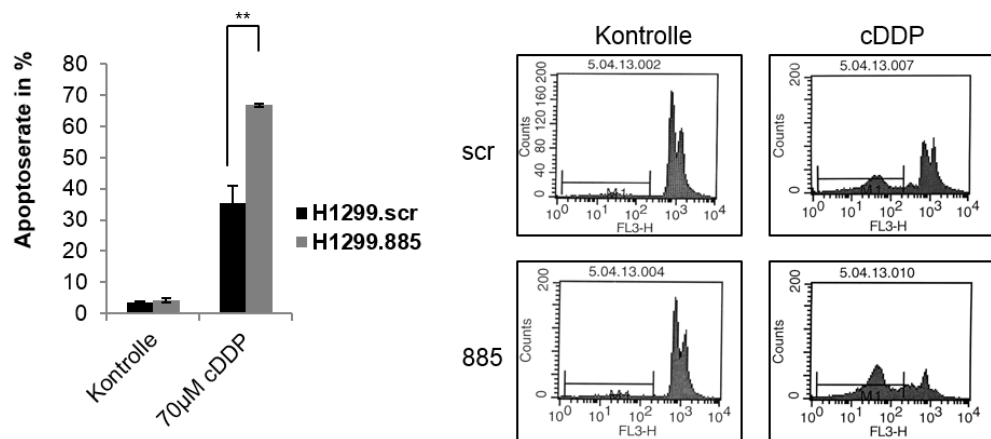
**Abb. 15: Veranschaulichung der Klonierung von miR-885** (A) Genkarte des mir-885-Gen tragenden WPXL-Plasmids, eingefügt über die Loci *Pme*-I und *Mlu*-I. (B) Gelbild nach gelelektrophoretischer Auftrennung zur Verifikation der Klonierung. Der Vektor (10790 bp) wurde durch das Restriktionsenzym *Age*-I an 3 spezifischen Stellen geschnitten (siehe Genkarte). Dabei repräsentieren die Banden auf Höhe von 6000 und 4000 bp die WPXL-Plasmid-Fragmente und die Bande auf Höhe von 1500 bp die miR-885.

Der Transduktionserfolg wurde durch quantitative TaqMan® *real-time* PCR kontrolliert (Abb. 16).



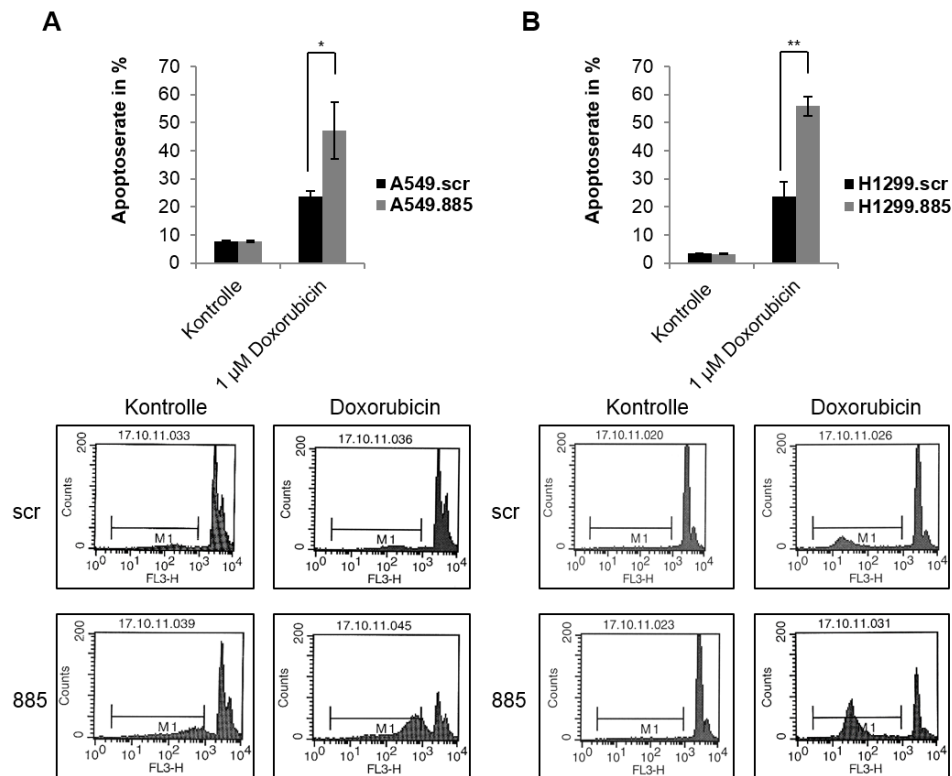
**Abb. 16: Etablierung stabil miR-885-exprimierender Zellen mittels lentiviralem Gentransfer.** Kontrollmessung der überexprimierten miR-885-Level in A549 (A) und H1299 (B) durch TaqMan® qRT-PCR (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Für den Nachweis einer erhöhten Chemosensibilität wurden die Zellen mit cDDP und Doxorubicin behandelt, 48 Stunden später nach Protokoll (2.2.1.8) geerntet und mit DNA-interkalierenden Propidiumiodid inkubiert. Anschließend wurde die Apoptoserate durch Bestimmung des sub-G1-DNA-Gehalts der Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt.



**Abb. 17: Erhöhte Chemosensibilität unter miR-885-Überexpression nach Cisplatin-Applikation.** (links) 30 %iger Anstieg der Apoptoserate nach 48 h unter miR-885-Überexpression in H1299-Zellen. (rechts) Original FACS-Diagramme: Messung des zellulären Fluoreszenzgehalts (PI) x-Achse einer bestimmten Anzahl von Zellen (y-Achse). Innerhalb des markierten M1-Gates befindet sich die für die zelluläre Apoptose stehende subG1-Phase. Hierbei liegt der subG1-Peak in miR-885-überexprimierenden H1299-Zellen deutlich höher als im Vergleich zur Kontrolle (\*\*p < 0,01).

Hierbei wurden in stabilen miR-885-H1299-Zellen unter cDDP-Behandlung (Abb. 17) sowie in beiden Lungenkrebszelllinien unter Doxorubicin-Gabe (Abb. 18) eine um 30 % erhöhte Apoptoserate gemessen. Hieraus ergibt sich, dass miR-885 chemosensibilisierende Wirkung hat.



**Abb. 18: Erhöhte Chemosensibilität unter miR-885-Überexpression nach Doxorubicin-Applikation in (A) A549- und (B) H1299-Zellen. (oben) Anstieg der Apoptoserate nach 48 h unter miR-885 Überexpression (unten) Original FACS-Diagramme: Messung des zellulären Fluoreszenzgehalts (PI) x-Achse einer bestimmten Anzahl von Zellen (y-Achse). Innerhalb des markierten M1-Gates befindet sich die für die zelluläre Apoptose stehende subG1-Phase. Hierbei ist der subG1-Peak in miR-885-überexprimierenden Lungenkrebszelllinien deutlich größer als im Vergleich zur der Kontrolle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).**

### 3.3 Einfluss der p73-miR-885-Kaskade auf die IGF-IR-Expression und den IGF-IR-Signalweg

Sowohl die in 3.1 und 3.2 demonstrierte p73-abhängige miR-885-Geninduktion als auch das in 3.2.2 dargestellte gesteigerte Ansprechen auf Zytostatika nach miR-885-Überexpression führten zu der Annahme, dass miR-885 eine tumorsuppressive bzw. chemosensibilisierende Funktion haben könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, war die Evaluation von miR-885-regulierten Zielgenen entscheidend. Anhand der Internetdatenbank miRBase.org (Griffiths-Jones et al., 2006), auf der über bioinformatische Methoden miRs und zugehörige spezifische Zielgene bzw. „Targetgene“ ermittelt und archiviert werden, wurden von den für miR-885 vorgeschlagenen bzw. „predicted“ „Targets“ gezielt ausgewählt (Abb. 19). Hierbei handelt es sich um Onkogene, die eine anti-apoptotische Rolle oder ein positiver Effekt



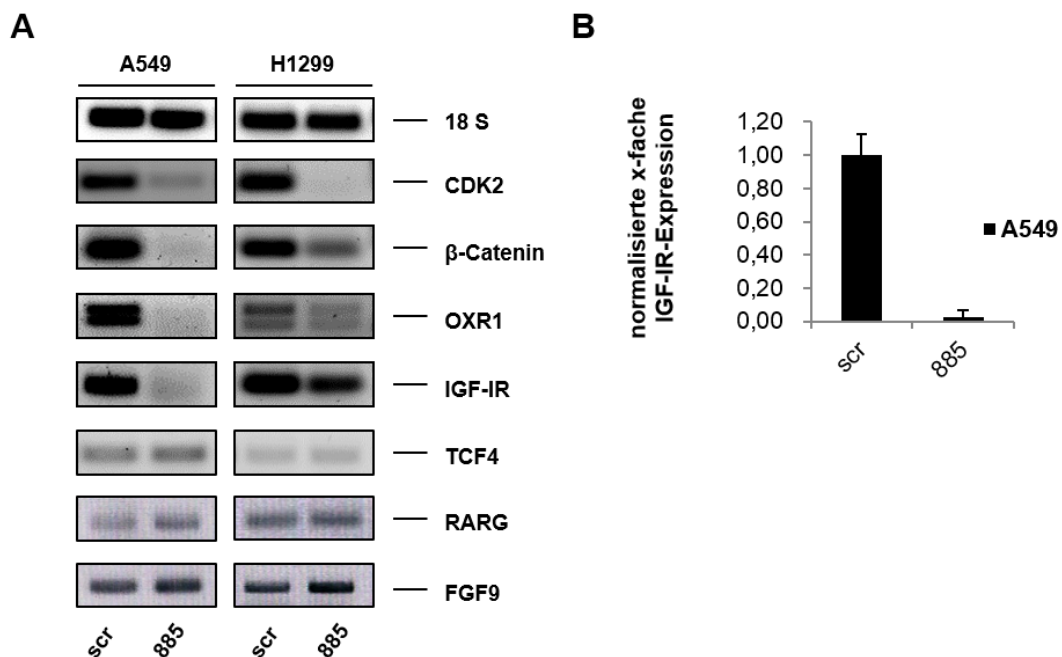
auf die Zellmotilität insbesondere im Zusammenhang mit der Aktivierung von EMT (Epithelial-mesenchymale Transition) besitzen.

Targetgen von miR-885	Funktion	mirSVR Score ( <i>Prediction score</i> )
<b>OXR1</b> ( <i>Oxidation Resistance Protein 1</i> )	Anti-Oxidanz , Zellprotektion vor reaktiven oxidativen Spezies (ROS).	-2,33
<b>CTNNB1</b> ( <i>β-Catenin</i> )	Bekanntes Onkogen, <i>key player</i> des wnt-Signalwegs, In der Ausbildung von Zellzellkontakten beteiligt, Förderung der Zellmotilität und Invasivität von Tumoren ( <i>KEGG pathway: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )	-2,13
<b>IGF-IR</b> ( <i>Insulin-like Growth Receptor 1</i> )	Membranständiger Rezeptor des IGF-Signalwegs, Aufrechterhaltung von Wachstumseffekten, bekanntes Onkogen bzw. Tumorsignalweg, Förderung der Chemoresistenz, Zellmotilität und Metastasierung von Tumoren ( <i>KEGG pathway: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> )	-0,19
<b>RARG</b> ( <i>Retinoic acid receptor gamma</i> )	Nukleärer Rezeptor (Heterodimer RAR/RXR), hormonelle Prozesse, Wachstumsprozess	-0,29
<b>FGF9</b> ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )	Wachstumsfaktor der FGF Familie, Zellproliferation, -morphogenese, Tumorwachstumsförderung und Invasion	-0,72
<b>TCF4</b> ( <i>Transcription Factor 4</i> )	Rolle im wnt-Signalweg (Embryogenese, Entwicklung, Tumorgenese)	-0,41

**Abb. 19: Tabellarische Darstellung der Auswahl von miR-885-spezifischen Target-Onkogenen mit zugehöriger Funktion und Prediction Score.** Die Auswahl beschränkte sich auf bekannte Onkogene mit antagonistischer Funktion auf die Apoptose sowie positiven Effekten auf die Zellmigration und –invasivität im Rahmen der EMT. Der mirSVR Score ist ein empirischer Score, welcher die mRNA-Downregulations Wahrscheinlichkeit angibt. Er wurde anhand von Regressionsmodellen durch sequenz- und kontextabhängige Eigenschaften zwischen miR + mRNA Duplex ermittelt (weitläufige Expressionsprofile in Säugetiergewebe vgl. gesund vs. pathologisch).

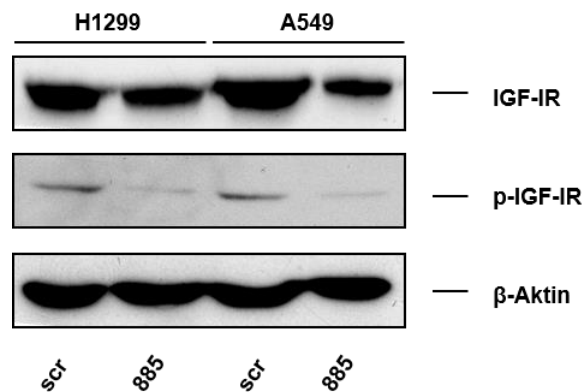
### 3.3.1 Überexpression von miR-885 inhibiert die endogene IGF-IR-Expression

Zur Identifikation bzw. Verifikation putativer miR-885-Zielgene wurde deren Transkriptionsniveau in stabil miR-885-exprimierenden A549 und H1299 durch sqPCR analysiert. Das CDK2-Gen, das negativ durch miR-885 reguliert wird (Afanasyeva et al., 2011), diente dabei als Positivkontrolle. In beiden Zelllinien wurde eine verringerte Expression von IGF-IR, OXR1 und  $\beta$ -Catenin im Vergleich zur Kontrolle detektiert (Abb. 20). Vor dem Hintergrund, dass der IGF-I-Rezeptor ein bekanntes Onkogen darstellt, das verbunden mit einer erhöhten Aktivität des IGF-IR-vermittelten Signalwegs zu einer vermehrten Chemoresistenz führt (Dallas et al., 2009; Hsu et al., 2013) und unsere Forschungsgruppe kürzlich die Aktivierung des IGF-IR-Signalwegs durch DNp73 in SK-Mel-29 nachgewiesen hat (Steder et al., 2013), wurde IGF-IR als interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die mittels quantitativer *real-time* PCR durchgeführte Bestimmung der Transkriptionsrate ergab eine um mehr als 90 % verminderte Expression von IGF-IR in stabilen A549-miR-885-Zellen.



**Abb. 20: Reduktion des Transkriptionsniveaus von IGF-IR, OXR1 und  $\beta$ -Catenin in stabil miR-885-exprimierenden Lungenkrebszellen. (A)** Messung der endogenen Genexpression von CDK2,  $\beta$ -Catenin, OXR1, IGF-IR, TCF4, RARG und FGF9 durch sqPCR in A549 und H1299. **(B)** Messung der Genexpression von IGF-IR in stabil miR-885-überexprimierenden A549-Zellen durch qRT-PCR.

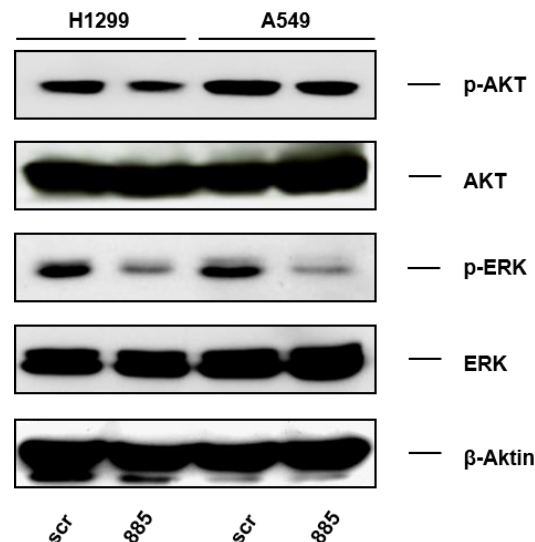
Als nächstes wurde der Anteil von Gesamtprotein IGF-IR- und aktivierten phospho-IGF-IR (p-IGF-IR) in beiden stabilen Lungenkarzinomzelllinien anhand von Western Blot-Analysen bestimmt, wobei  $\beta$ -Aktin als Lade-Kontrolle diente. Im Vergleich zu scr-Zellen weisen die Zelllysate mit miR-885 sowohl geringere IGF-IR- als auch p-IGF-IR-Level auf (Abb. 21). Anhand dieser Ergebnisse wird deutlich, dass eine Überexpression von miR-885 zur Reduktion der IGF-IR-Expression und -Aktivität führt.



**Abb. 21: Bestimmung des endogenen Proteinanteils von IGF-IR und  $\beta$ -Aktin (Kontrolle) durch Western Blot-Analyse.** Die Reduktion von Gesamt-IGF-IR- sowie phosphoryliertem IGF-IR-Anteil in stabil miR-885-exprimierenden Lungenkrebszellen A549 & H1299 demonstrieren eine Hemmung der IGF-IR-Expression sowie eine Einschränkung der Funktionalität des IGF-I-Rezeptors nach miR-885-Überexpression.

### 3.3.2 Überexpression von miR-885 inhibiert den IGF-IR-Signalweg

Nachfolgend wurde der Einfluss von miR-885 auf den IGF-IR-vermittelten Signalweg untersucht (Steelman et al., 2011). Vor dem Hintergrund, dass die intrazelluläre Signalkaskade nach Stimulierung von IGF-R im Wesentlichen über die Aktivierung der PI-3K/AKT- und MAPK/ERK-Kinasen verläuft, wurde die Menge an phosphoryliertem AKT und ERK in miR-885 exprimierenden A549- und H1299-Zellen ermittelt. Hierbei zeigten sich in beiden Zelllinien deutlich reduzierte phospho-AKT- und phospho-ERK-Level, während die Gesamtproteine keinen Unterschied aufweisen (Abb. 22). Hieraus ergibt sich, dass miR-885 die Aktivität des IGF-IR-Signalwegs abschwächt. Dieses könnte auf einer Abnahme der IGF-I-Rezeptordichte an der Zelloberfläche basieren, begründet durch die Hemmung der IGF-IR-Expression durch miR-885.

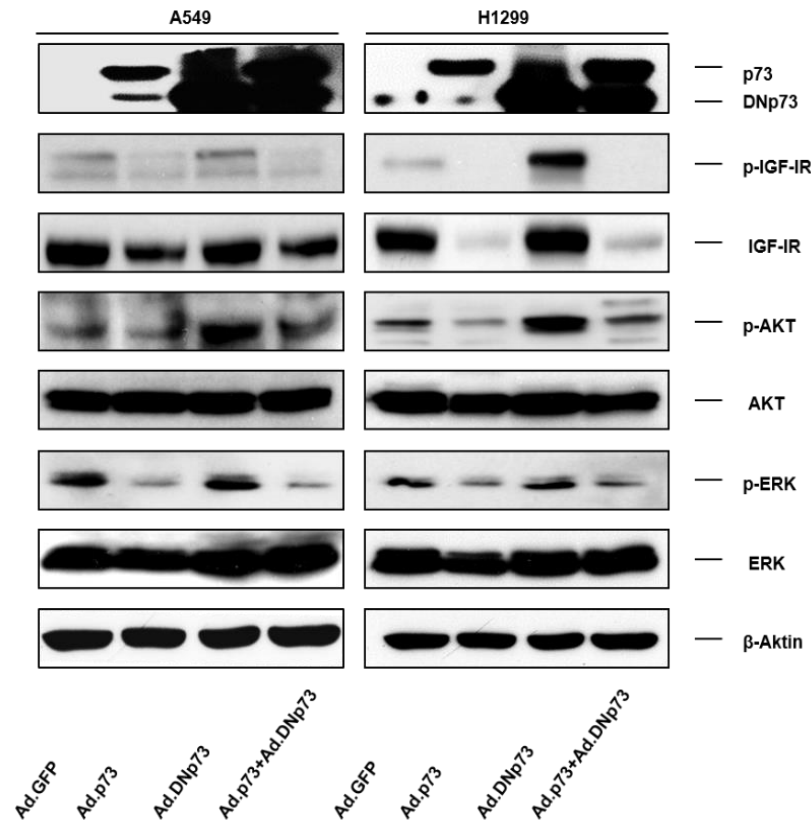


**Abb. 22:** Bestimmung der endogenen Proteinexpression der *Downstream*-Effektoren des IGF-IR-Signalwegs AKT und ERK sowie  $\beta$ -Aktin (Kontrolle) in stabil miR-885-exprimierenden Lungenkrebszellen durch Western Blot. Unveränderter AKT- und ERK-Proteinstatus sowie Reduktion der phosphorylierten AKT- und ERK-Level in H1299-miR-885 und A549-miR-885 deuten auf eine Abschwächung des IGF-IR-vermittelten Signalwegs nach miR-885-Überexpression hin.

### 3.3.3 Einfluss von p73 versus DNp73 auf die IGF-IR-Expression und den IGF-IR-vermittelten Signalweg

Die zuvor erhobenen Daten legen nahe, dass DNp73 den IGF-IR-Signalweg über die gegenläufige Regulation von miR-885 kontrolliert. Um den direkten Einfluss der antagonisierenden p73-Proteine auf IGF-IR und die Signaleffektorproteine AKT/ERK zu analysieren, wurden A549- und H1299-Zellen mit Ad.p73, Ad.p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$  oder beiden Viren (Ad.p73+Ad.p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$ ) infiziert. Die danach durchgeführten Western Blots zeigten, dass, wie zuvor für die miR-885 beobachtet, sowohl das Gesamtprotein als auch die phosphorylierte Form des Rezeptors unter p73-Überexpression abnimmt (Abb. 23). Im Vergleich dazu lag in DNp73-exprimierenden H1299 ein höherer Anteil von IGF-IR und p-IGF-IR vor. Die Koexpression von p73 und DNp73 führte in beiden Zelllinien zu einer geringgradig erhöhten IGF-IR- und p-IGF-IR-Proteinexpression. Die Gesamt-AKT- und -ERK-Level blieben in beiden Tumorzelllinien unverändert konstant. Der AKT/ERK-Phosphorylierungsstatus war dagegen nach p73-Überexpression reduziert und nach DNp73-Überexpression erhöht. Die p73+DNp73-Koexpression zeigte ein höheres p-AKT-Proteinexpressionsniveau im Vergleich zur alleinigen p73-Transduktion, die aber auch hier verglichen mit der GFP-Kontrolle niedriger war. Danach korrelieren

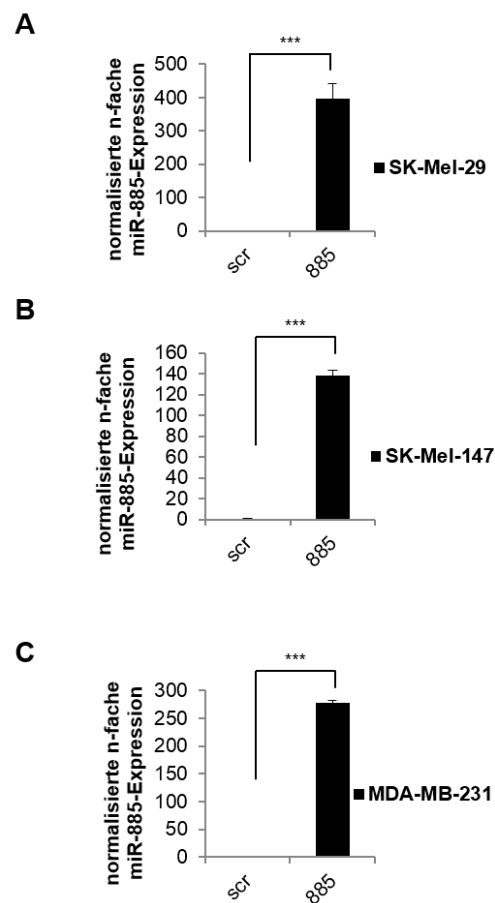
die Ergebnisse bei p73-Expression mit denen der miR-885-Überexpression hinsichtlich der Repression des IGF-IR-Onkogens.



**Abb. 23: Bestimmung der endogenen Proteinexpression von IGF-IR und der IGF-IR-Signalwegseffektoren AKT & ERK sowie  $\beta$ -Aktin (Kontrolle) nach p73-Transduktion in Lungenkrebszellen.** Reduzierte IGF-IR- und p-IGF-IR-Proteinlevel, sowie reduzierter Phosphorylierungsstatus von AKT in H1299 und A549 nach ektopter p73-Expression unterstützen die p73-abhängige miR-885-Regulation hinsichtlich der Hemmung des IGF-IR-Signalwegs durch miR-885.

### 3.4 Charakterisierung der Funktion von miR-885

In Anbetracht des hemmenden Effekts von miR-885 auf die IGF-IR-Expression sowie der reduzierten Aktivität des IGF-IR-vermittelten Signalwegs wurden im Folgenden *in vitro*-Funktionsanalysen unter stabiler miR-885-Expression (siehe 3.2.2) mit A549- und H1299- (Abb. 16), SK-Mel-147- und MDA-MB-231-Zellen durchgeführt (Abb. 24). Dabei wurden bekannte IGF-IR-abhängige Effekte wie Zellproliferation und Zellmotilität untersucht. Ein Chemosensibilitäts-fördernder Effekt durch miR-885 konnte, wie bereits in 3.2.2 beschrieben, bereits nachgewiesen werden.

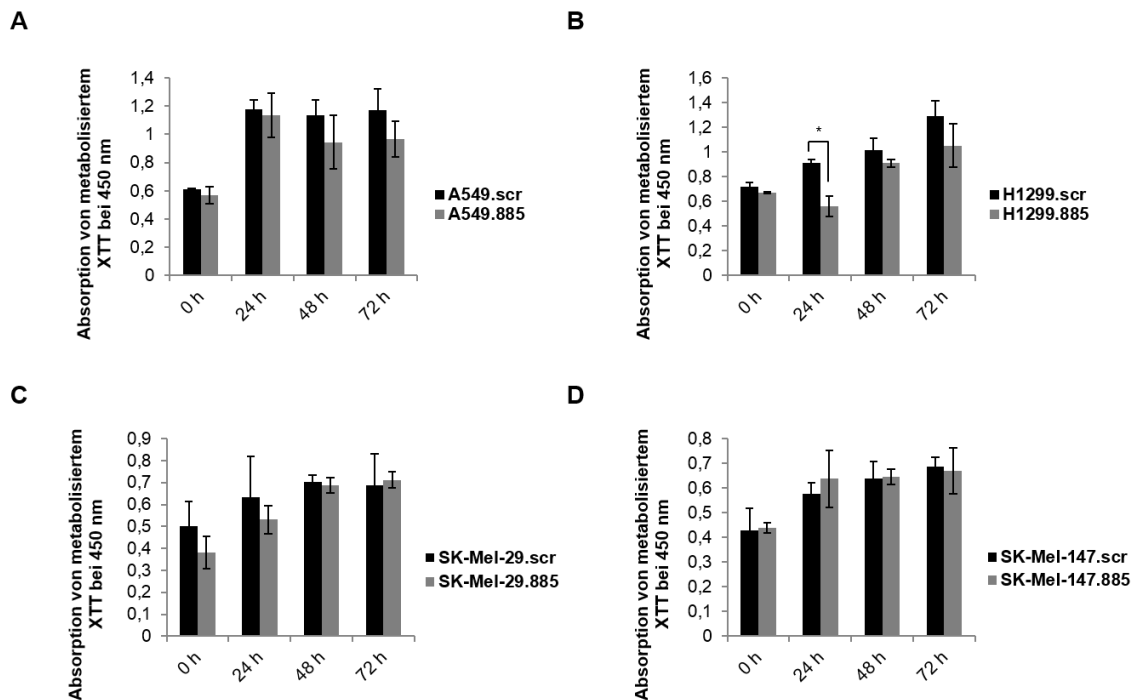


**Abb. 24: Etablierung einer stabilen *in vitro*-miR-885-Überexpression mittels lentiviraler Transduktion.** Kontrollmessung der überexprimierten miR-885-Level in SK-Mel-29 (A), SK-Mel-147 (B) und MDA-MB-231 (C) durch TaqMan® qRT-PCR (\*\*p < 0,01).

### 3.4.1 Unveränderte Zellproliferation nach miR-885-Überexpression

Die Zellproliferation unter stabiler miR-885-Überexpression wurde mit Hilfe des XTT-Proliferationsassays (2.2.1.6) untersucht. Durch photometrische Messung der XTT-Verstoffwechslung kann die metabolische Aktivität bzw. Vitalität von Zellen bestimmt werden, die ebenso einen Aufschluss über die Zellproliferation gibt. Die Photometer-Messungen (bei 450 nm) erfolgten nach 0, 24, 48 und 72 Stunden. Nach 24 Stunden konnte lediglich in H1299 eine reduzierte Proliferationsrate beobachtet werden (Abb. 25). H1299-miR-885 wiesen dabei eine etwas niedrigere Proliferation auf. Insgesamt aber stiegen die Proliferationsraten in allen Zellen mit stabiler miR-885 nach 48 und 72 Stunden, sodass hier ein Wachstumshemmender Effekt von miR-885

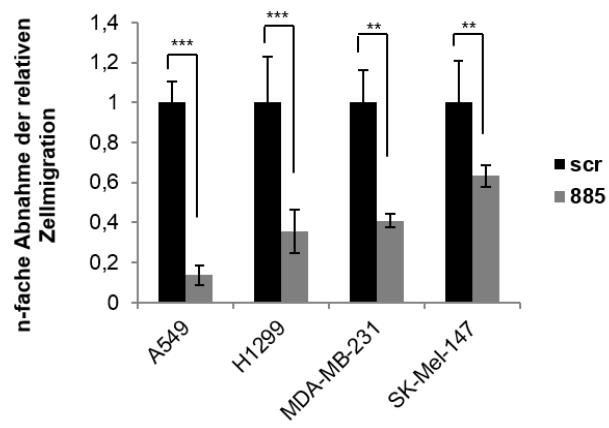
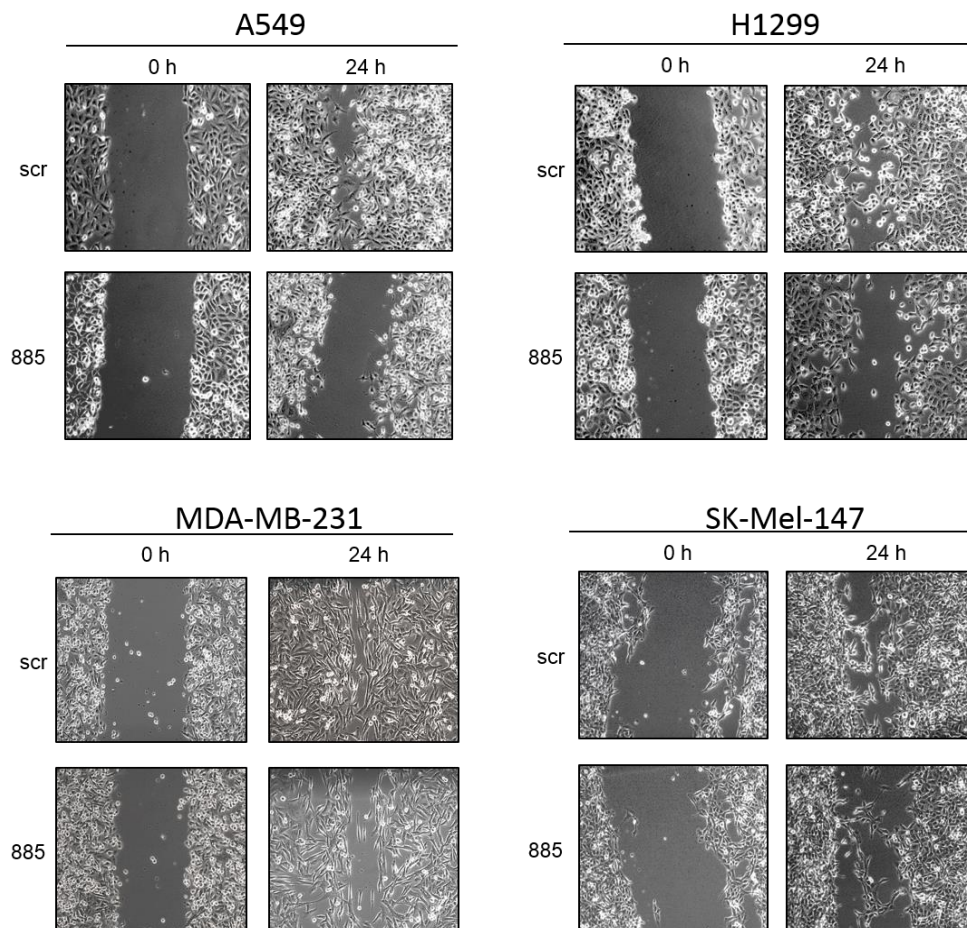
ausgeschlossen werden kann. Anhand der Messergebnisse in H1299-Zellen könnte man allenfalls eine Reduktion der Proliferationsgeschwindigkeit durch miR-885 diskutieren.



**Abb. 25: Photometrische Absorptionsbestimmung von metabolisiertem XTT nach 0, 24, 48 und 72 Stunden in (A) A549, (B) H1299, (C) SK-Mel-29 und (D) SK-Mel-147. Unveränderte Proliferationsrate unter miR-885-Überexpression.**

### 3.4.2 Reduzierte Zellmigration nach miR-885-Überexpression

Um das Migrationsverhalten unter forcierter miR-885-Expression zu untersuchen, wurden *scratch assays* (Wundheilungsassays) (2.2.1.5) durchgeführt. Dabei wurde ein *scratch* mit Hilfe einer Pipettenspitze auf einer konfluenten Zellplatte erzeugt und die Zellwanderung in die Wundfläche mittels *ImageJ*-Software quantifiziert und ausgewertet (Abb. 26). Im Vergleich zur Kontrolle konnte in allen miR-885-exprimierenden Zelllinien eine starke Reduktion der Migrationsrate bei unveränderter Zellproliferation detektiert werden.

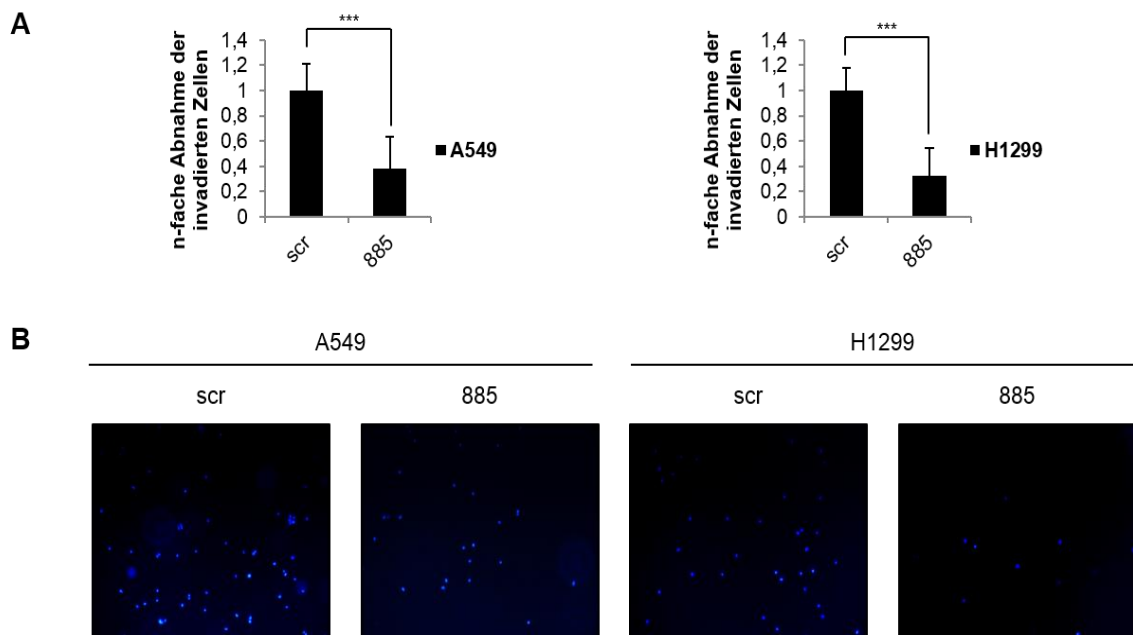
**A****B**

**Abb. 26: Analyse der Zellmigration. (A)** Signifikante Abnahme der relativen Migration in A549, H1299, MDA-MB-231 und SK-Mel147 unter miR-885-Überexpression (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001). **(B)** Repräsentative lichtmikroskopische Aufnahmen der künstlichen Wundfläche nach 0 und 24 h.



### 3.4.3 Reduzierte Zellinvasion nach miR-885-Überexpression

Analog zum Migrationsverhalten wurde die Rolle von miR-885 auch auf die Invasivität der Zellen mittels *Boyden Chamber assay* (2.2.1.7) untersucht. Im Unterschied zur Migration wird dabei die Zellwanderung durch eine artifizielle extrazelluläre Matrix analysiert. Die Zellen wurden nach 36-stündiger Inkubation im Matrigel mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt und die Anzahl der invadierten Zellen wurde mikroskopisch ermittelt. Auch hier fand sich eine stark verringerte Zahl invasiv wachsender miR-885-Zellen zur Kontrolle (Abb. 27). Folglich lässt sich mit dem beobachteten Rückgang der Migration und Invasion unter forcierter miR-885-Überexpression eine hemmende Funktion von miR-885 auf die Zellmotilität ableiten.



**Abb. 27: Analyse der Zellinvasion in A549 & H1299. (A)** Signifikante Reduktion der Zellinvasion in stabil miR-885-überexprimierenden A549 und H1299 (\*\*p < 0,01). **(B)** Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der invadierten A549- und -H1299-Zellen nach DAPI-Zellanfärbung.

Zusammenfassend wird in den vorliegenden Ergebnissen der hemmende Einfluss von miR-885 auf die IGF-IR-Achse deutlich. Über die Regulation der IGF-IR-Expression und Aktivität durch miR-885 kommt es zur Chemosensibilisierung und Suppression der Zellmotilität/Invasivität aggressiver Tumorzellen.

## 4 Diskussion

In den Industrienationen stehen Tumorerkrankungen an 2. Stelle der häufigsten Todesursachen. Alternative und effiziente Behandlungen zu herkömmlichen Radio- und Chemotherapien zu entwickeln, stellt die Wissenschaft auch in der heutigen Zeit vor große Herausforderungen.

Mit der Entdeckung der p53-Mitglieder und ihrer vielfältigen antagonistischen Funktion werden neben der Aufklärung zur Tumorentstehung und -progression auch gentherapeutische Behandlungsmethoden vorstellbar. Im Gegensatz zu p53 ist p73 in Tumoren nur in wenigen Ausnahmefällen von Mutationen betroffen und nimmt daher einen besonders interessanten Forschungsschwerpunkt ein. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass die gleichzeitige Anwesenheit der antagonistischen N-terminal verkürzten p73-Isoformen eine funktionelle Inaktivierung der p53/p73-Wildtypproteine hervorruft und so die Karzinogenese maßgeblich beeinflusst (Di et al., 2013; Costanzo et al., 2014). Dabei haben Studienergebnisse offenbart, dass resistente und hoch-aggressive Tumorzellen einen hohen DNp73-Anteil aufweisen (Stiewe et al., 2002; Emmrich et al., 2009). Neuere Erkenntnisse machen deutlich, dass die onkogene Rolle von DNp73 über die dominant-negative Funktion hinausgeht und als weitaus komplexer zu betrachten ist. In diesem Kontext hat unsere Forschungsgruppe erst kürzlich die DNp73-abhängige Aktivierung der IGF-IR-AKT/STAT3-Achse in Melanomzellen entdeckt, was zur Induktion der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) führt (Steder et al., 2013). Im Zusammenhang mit der Entstehung von Tumorstammzellen, die durch ein hohes Maß an Aggressivität, Invasivität sowie der Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Chemoresistenz gekennzeichnet sind, wird DNp73 zudem aktuell als Schlüsselregulator im Rahmen der Stammzellinduktion diskutiert (Engelmann et al., 2014, Meier et al., Publikation in Vorbereitung). In Anbetracht dessen, dass die Ausbildung von Chemoresistenzen einen der wesentlichen Gründe für das Therapieversagen der Tumorbehandlung darstellt (Wilson et al., 2006), ist es für die Aufstellung neuer Therapiestrategien von großem Interesse, neue Signalwege aufzudecken, die mit p73-induzierter Apoptose in Verbindung stehen und so unter DNp73-induzierten Resistenzmechanismen gezielt zu aktivieren. Aufgrund ihres genregulatorischen Potentials wird dabei insbesondere die Regulation von p73-abhängigen miRs diskutiert, die in Tumorzellen unabhängig von funktionell inaktivem p53 chemosensibilisierend wirken können (Alla et al., 2012, Knoll et al., 2013, Vera et al., 2013).

In der vorliegenden Doktorarbeit ging es darum, die Funktion von miR-885 als potentielle Zielstruktur von p73 näher zu charakterisieren. Da der IGF-I-Rezeptor verbunden mit

einer erhöhten Aktivität des IGF-IR-vermittelten Signalwegs zur verstärkten Apoptose-Resistenz führt (Dallas et al., 2009; Hsu et al., 2013) und DNp73 über die Aktivierung der IGF-IR-AKT/STAT3-Achse die Tumorprogression entscheidend beeinflusst, stand hier außerdem die Regulation der IGF-IR-Expression und Aktivierung des Signalwegs durch p73/DNp73 und miR-885 im Fokus.

#### 4.1 Antagonistische Wirkung von p73 und DNp73 auf die miR-885-Expression

Da die miR-885 bisher nur im Zusammenhang mit p53 und  $\Delta$ p63 analysiert wurde, stellte sie einen besonders interessanten Kandidaten dar. In Bezug auf p53 haben Afanasyeva et al. gezeigt, dass miR-885 die Expression von p53 sowie von p53-abhängigen Genen fördert und die mitogenen Faktoren wie CDK2 und MCM5 supprimiert (Afanasyeva et al., 2011). Huang et al. haben darüber hinaus beobachtet, dass die Inaktivierung von anti-apoptotischem  $\Delta$ p63 unter Cisplatin-Behandlung die Induktion von miR-885 hervorruft (Huang et al., 2011). In Anbetracht der großen Homologien innerhalb der p53-Familie lag die Vermutung nahe, dass die Expression von miR-885 auch durch p73 reguliert wird. Diese Hypothese konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl in der eingangs durchgeführten *TaqMan®-MicroArray*-Analyse in SK-Mel-29-Melanomzellen als auch in Einzelanalysen in unterschiedlich aggressiven Melanom- und Lungenkarzinomzellen bestätigt werden. Hierbei führte die ektopische Expression der verwendeten TAp73 $\beta$ -Isoform, die allgemein als stärkster Apoptoseinduktor unter den Wildtyp-Isoformen gilt (Stiewe & Pützer, 2002) in allen untersuchten Zelllinien zu signifikant erhöhten miR-885-Leveln. Dementsprechend ergab die Depletion von endogenem p73 einen Expressionsabfall der miR-885. Angesichts der Schlüsselfunktion von p73 im programmierten Zelltod konnte ein aktivierender Einfluss von p73 auf die miR-885-Expression im Rahmen der p73-induzierten Apoptose nachgewiesen werden. Basierend auf der Erkenntnis, dass Chemotherapeutika die Aktivierung von p73 über c-Abl-abhängige Phosphorylierung fördern (Gong et al., 1999; Lunghi et al., 2009), welches im weiteren Verlauf die Induktion diverser pro-apoptotischer Faktoren zur Folge hat, führte die Behandlung der Zellen mit cDDP oder Doxorubicin zum Anstieg von miR-885, welcher konsequenterweise nach *Knock-down* von p73 aufgehoben wurde. Die wesentliche Funktion von miRs in Apoptose-Signalwegen ist seit längerem bekannt. Die Mitglieder der p53-Familie induzieren miRs, welche durch die post-transkriptionelle Hemmung der Expression von anti-apoptotischen Faktoren funktionell als Apoptose-Effektoren in den Zellen agieren (He et al., 2007; Jones et al., 2012). Insbesondere für die direkt durch p53-regulierte miR-34-Familie wurde von

verschiedenen Gruppen eine pro-apoptotische Funktion nachgewiesen. Durch ein miR-34-induziertes *Gensilencing* von c-Kit und Bcl-2 kommt es beispielsweise zur Erhöhung des programmierten Zelltods, was im Rahmen der Zytostatikatherapie zur Chemosensibilisierung beiträgt (Siemens et al., 2013; Dong et al., 2013; Misso et al., 2014). Der Einfluss von p73 auf die miR-Expression war diesbezüglich noch weitgehend unerforscht. Vor dem Hintergrund, dass in HSCC-Zellen eine pro-apoptotische Funktion von miR-885 durch Hemmung der Genexpression von Bcl-2 gefunden wurde (Huang et al., 2011) und EPO in neuronalen Zellen einen anti-apoptotischen Effekt durch Inhibition von miR-885 besitzt (Alural et al., 2014), war im Vorfeld eine wichtige Rolle von miR-885 in der Apoptose denkbar. Diese Vermutung konnte hier ebenfalls mit dem Auftreten einer erhöhten Chemosensibilität unter Überexpression von miR-885 sowie gleichzeitiger Cisplatin- bzw. Doxorubicin-Gabe bestätigt werden. Die dagegen beobachtete Repression der miR-885 Expression nach p73-*Knock-down* macht deutlich, dass die Expression von miR-885 mit endogen induziertem p73 nach DNA-Schädigung in Verbindung stehen könnte.

Angesichts der genregulatorischen Eigenschaften von miRs liegt die Vermutung nahe, dass die Tumorprogression durch gezieltes Eingreifen in die miR-Regulation gefördert wird. In diesem Zusammenhang wurde in Lungenkarzinomzellen gezeigt, dass es über epigenetische Inaktivierung von miR-200 zum G1-Arrest bzw. zur Unterdrückung des Zellwachstums und zur Apoptose-Induktion kommt (Chen et al., 2014). Neben der durch mutiertes p53 (mutp53)-hervorgerufenen Chemoresistenz infolge einer Hemmung der Expression von pro-apoptotischen miRs (Masciarelli et al., 2014) konnten Ory und Kollegen für p63/p73 in resistenten squamösen Karzinomzellen einen miR-beeinflussten Signalweg identifizieren (Ory et al., 2011). Hinsichtlich der Chemoresistenzentwicklung in malignen Zellen mit Wildtyp-p73 spielt die Hemmung der Funktionalität von pro-apoptotischem TAp73 eine entscheidende Rolle. Neben der epigenetischen Inaktivierung von p73 durch DNA-Deacetylierung ist die Erhöhung des onkogenen DNp73-Anteils ausschlaggebend (Dotsch et al., 2010; Schipper et al., 2014). Der anti-apoptotische Effekt der N-terminal verkürzten p73-Isoform lässt sich dabei durch die dominant-negative Funktion von DNp73 erklären (Maas et al., 2013; Candi et al., 2014). Durch Formation Transaktivierungs-defizienter Heteroduplex-Komplexe oder durch direkte Konkurrenz um p53-abhängige DNA-Bindungsstellen hemmt DNp73 die transkriptionelle Aktivität von TAp73, welches die Suppression p53/p73-abhängiger pro-apoptotischer Zielgene zur Folge hat (Stiewe et al., 2002; Seitz et al., 2010; Bantel et al., 2010). In Anbetracht der nachgewiesenen p73-regulierten miR-885-Expression führte sowohl eine alleinige ektope Überexpression von

p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$  als auch eine ektope p73 $\Delta$ Ex2/3 $\beta$ -Überexpression in Kombination mit p73 $\beta$  zu einer deutlichen Reduktion der miR-885-Level. Da mit Hilfe eines spezifisch gegen die amino-trunkierte Isoform  $\Delta$ Ex2/3p73 gerichteten *Anti-sense* Oligonukleotids (ASO-116) DNp73 geblockt und dass der aggressive Phänotyp in hoch-invasiven und chemoresistenten Tumorzellen aufgehoben wird (Emmrich et al., 2009; Engelmann et al., 2014), wurde in ASO-116-behandelten Melanom- und Lungenkarzinomzellen mit hohem DNp73-Anteil eine Re-Induktion von miR-885 beobachtet. Im Kontext der bisher entdeckten p53/p73-induzierten miR-Signalwege, die eine chemosensibilisierende Wirkung in der Zelle haben, lassen sich weitreichende bzw. komplexe Effekte durch die antagonistischen p73-Protein-Isoformen ableiten. Diesbezüglich wurde von uns gezeigt, dass es in Gegenwart von DNp73 zu einer Hemmung der p73-abhängigen miR-205-Induktion kommt, welches zu einer Aufhebung des miR-205-geförderten *Gensilencing* der anti-apoptotischen Moleküle E2F1, Bcl-2 und der ATP-bindenden Transporter ABCA2 und ABCA5 führt und die Zellen resistenter gegenüber Chemotherapie macht (Alla et al., 2012). Die Bestimmung der endogenen miR-885-Expression in unterschiedlich aggressiven Melanom- und Lungenkrebszelllinien machen diesbezüglich die tumorsuppressive Funktion deutlich. In den hoch-invasiven/metastasierten und chemoresistenten Melanomzelllinien SK-Mel-147 und SK-Mel-103, die bekanntlich einen höheren DNp73-Proteinanteil aufweisen (Tuve et al., 2004; Steder et al., 2013), wurde eine deutlich reduzierte miR-885-Expression im Vergleich zu niedrig malignen SK-Mel-29-Zellen mit geringen DNp73-Leveln beobachtet. In Anbetracht bisher unveröffentlichter Ergebnisse unserer Forschungsgruppe, die zeigen, dass H1299-Zellen eine höhere DNp73-Expression als A549-Zellen besitzen, konnte in H1299-Zellen ebenfalls eine verringerte miR-885-Expression detektiert werden. Ausgehend von der demonstrierten Regulation durch p73 sowie dem chemosensibilisierenden Effekt von miR-885 wäre anzunehmen, dass es durch DNp73 zur Hemmung der miR-885-Expression und zur Ausbildung von Chemoresistenz kommen könnte.

#### **4.2 Repression der IGF-IR-Expression und des IGF-IR-Signalwegs durch miR-885**

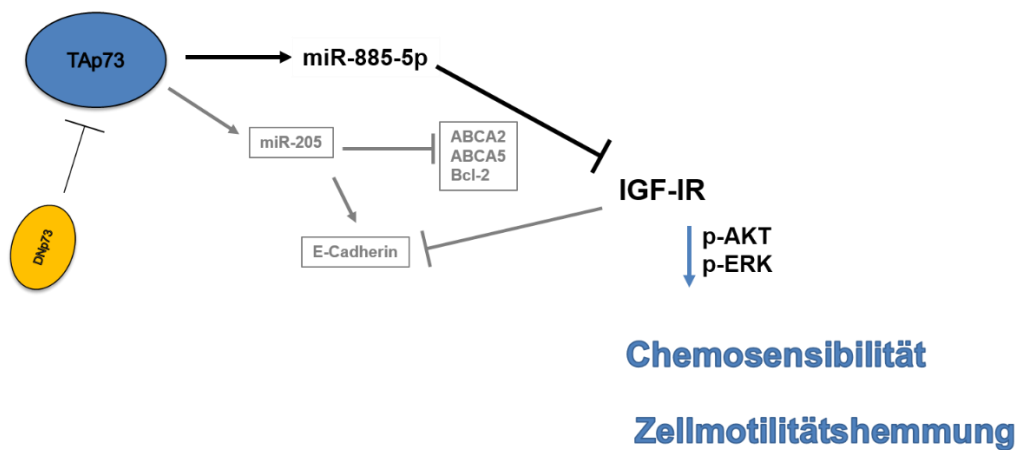
Nachdem gezeigt werden konnte, dass miR-885 durch p73 induziert wird und seinerseits eine chemosensibilisierende Funktion besitzt, stellte sich die Frage, welcher molekulare Mechanismus diesem zu Grunde liegt.

Der IGF-I-Rezeptor und IGF-IR-vermittelte Signalweg wird sowohl mit Therapieresistenzentwicklung als auch mit DNp73-induzierter Metastasierung und Stammzellinduktion in Zusammenhang gebracht (Fischer et al., 2007; Engelmann et al., 2014). Ausgehend von einer erhöhten IGF-IR-Aktivität in hoch-aggressiven Tumorzellen konnte in der Vergangenheit von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die IGF-IR-Achse maßgeblich am Prozess der Entwicklung chemoresistenter-Tumorphänotypen beteiligt ist (Sekharam et al., 2003; Baserga, 2005). In resistenten HCC-Zellen kommt es beispielsweise in Gegenwart von Apacidin (HDAC-Inhibitor) über die Aktivierung des IGF-IR-Signalwegs zur Hemmung der Expression pro-apoptotischer Effektorproteine wie Fas, BAD sowie Cytochrom C und folglich zur Inhibition der intrinsischen und extrinsischen Apoptose (Hsu et al., 2013). In Oesophagus-Karzinomzellen wurde die Beteiligung der IGF-IR-Kaskade in Zusammenhang mit der Förderung von Proliferation und zellulärem Überleben nachgewiesen, wobei außerdem ersichtlich wurde, dass eine gezielte IGF-IR-Blockade chemosensibilisierend wirkt und zur Hemmung von Tumorwachstum und Metastasenbildung führt (Li et al., 2014). Ähnliches konnte in kolorektalen Tumorstammzellen nachgewiesen werden. Eine gezielte Hemmung des Wachstumsrezeptors hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein verbessertes Ansprechen auf Chemotherapeutika zur Folge (Dallas et al., 2009).

Laut Nahor et al. (2005) führt TAp73 unabhängig vom p53-Status in kolorektalen Karzinomzellen zur Reduktion der IGF-IR-Expression. Umgekehrt kommt es in Gegenwart der N-terminal verkürzten DNp73-Isoform zur Induktion von IGF-IR (Nahor et al., 2005). Unsere Forschungsgruppe hat zudem erst kürzlich in aggressiven Melanomzelllinien nachgewiesen, dass DNp73 funktionell über die Aktivierung des IGF-IR-Signalwegs die EMT induziert. Dabei handelt es sich um einen wichtigen Schritt für die Zellinvasion und Metastasierung (Steder et al., 2013). Über eine DNp73-abhängige Repression des Zytoskelettproteins EPLIN sowie Verlust von E-Cadherin wird die Auflösung der Zell-Zellkontakte herbeigeführt. Gleichzeitig kommt es durch die DNp73-geförderte Modulation des Aktin-Zytoskeletts und die Inhibition (des Zell-Zellkontakt-Proteins) von E-Cadherin zur Exposition des IGF-I-Rezeptors für die Ligandenbindung und zur Aktivierung des IGF-IR-Signalwegs. Ausgehend von den endogen geringen miR-885-Leveln in aggressiven Tumorzellen mit hohem DNp73 stellte der IGF-I-Rezeptor und die IGF-IR-vermittelte Signaltransduktion aufgrund seines Resistenz- und Tumorprogressions-fördernden Effekts ein potentiell miR-885-Zielgen dar. Über eine DNp73-geförderte Aktivierung der IGF-IR-Kaskade im Rahmen der Chemoresistenzentwicklung war bisher nichts bekannt.

In dieser Arbeit konnte eine Hemmung der Expression des IGF-I-Rezeptors mit resultierender Funktionseinschränkung durch miR-885 bestätigt werden: Dabei resultierte eine forcierte Expression von miR-885 in hoch-aggressiven Lungenkarzinomzellen sowohl in einer Reduktion von Gesamt-IGF-IR als auch dessen aktivierter Isoform. Bezüglich der p73-abhängigen Expressionsregulation von miR-885 kam es unter TAp73-Überexpression außerdem zu einer Abnahme des IGF-I-Rezeptors sowie zu einer Abschwächung des IGF-IR-vermittelten Signalwegs. Die verstärkte Anwesenheit von onkogenem DNp73 führte hingegen zu einem Wiederanstieg von IGF-IR und zur Reaktivierung des Signalwegs. Basierend auf der Annahme, dass die miR-885-hervorgerufene Suppression von IGF-IR eine Abnahme der zellmembranständigen Rezeptordichte mit nachfolgender intrazellulärer Signalabschwächung zur Folge hat, wurde eine Repression der aktivierten bzw. phosphorylierten Form der IGF-IR-Signalwegseffektoren AKT und ERK sowohl unter verstärkter miR-885-Expression als auch unter ektopter p73-Expression festgestellt. Hinsichtlich der antagonistischen Funktion von DNp73 auf die p73-abhängige miR-885-Expression kam es unter verstärkter Anwesenheit von DNp73 zu einem Wiederanstieg der beiden IGF-IR-Signalwegseffektoren. Anhand dieser und anderer aktueller Forschungsergebnisse lässt sich ein entscheidender Einfluss von miRs auf die IGF-IR-Expression im Rahmen der Tumorprogression ableiten. So wurde beispielsweise in HeLa-Cervixkarzinomzellen für miR-223 eine antiproliferative Funktion über Hemmung des PI-3K/AKT/mTor/p70S6K-Signalwegs durch IGF-IR-*targeting* beschrieben (Jia et al., 2011). Im Zusammenhang mit der Induktion von EMT in Magenkarzinomzellen wurde nachgewiesen, dass miR-7 über direkte Hemmung der IGF-IR-Expression eine Reinduktion von E-Cadherin fördert und dass so der Verlust von Zell-Zellkontakten aufgehoben wird (Zhao et al., 2013). Ausgehend von einer miR-885-vermittelten IGF-IR-Suppression, welche über Aktivitätssenkung des IGF-IR-Signalwegs zur Reduktion der Genexpression von Apoptose-Effektorproteinen wie zum Beispiel BAD oder auch zur Hemmung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalwegs bzw. zur Inhibition von EMT führt (Cross et al., 1995; Steelman et al., 2011), ließen sich pro-apoptotische und motilitätshemmende Eigenschaften für miR-885 vermuten. Allgemein ist von miR-885 neben der bereits oben beschriebenen Apoptose-fördernden Funktion bekannt, dass es die Expression der zellzyklusfördernden CDK2-Kinase in Neuroblastomen reprimiert und dadurch Wachstumsarrest und verminderte Zellproliferation hervorruft (Afanasyeva et al., 2011). Während ein anti-proliferativer Effekt von miR-885 in den hier verwendeten Zelllinien nicht nachweisbar war, konnte neben der bereits erwähnten Steigerung der Chemosensibilität eine Hemmung

der Zellmigration und -invasion unter forcierter miR-885-Expression beobachtet werden. Zusammenfassend machen die Ergebnisse erstmals einen hemmenden Einfluss von miR-885 auf die IGF-IR-Achse deutlich. Die p73-vermittelte Induktion von miR-885 führt durch die negative Regulation der IGF-IR-Expression und Aktivität des IGF-IR-Signalwegs funktionell zur Chemosensibilisierung und zur Suppression der Zellmotilität/Invasivität aggressiver Tumorzellen (Abb. 28). In Anbetracht der bisher gezeigten gegenläufigen Regulation von miR-885 durch DNp73 wäre zudem vorstellbar, dass DNp73 durch Hemmung der p73-abhängigen miR-885-Expression die Reinduktion von IGF-IR und Aktivierung der IGF-IR-Signalkaskade fördert, welches die Ausbildung eines chemoresistenten, motilen und aggressiven Zelltyps zur Folge hätte.



**Abb. 28: Modell der Regulation und Funktion von miR-885 *in vitro*.** Dargestellt sind die für diese Arbeit wesentlichen molekularen Effekte von p73 und DNp73 auf die miR-Expression. Der neu aufgedeckte Mechanismus ist schwarz markiert. p73 reguliert die Expression von miR-885. miR-885 führt durch Hemmung der IGF-I-Rezeptor-Expression und des IGF-IR-vermittelten Signalwegs funktionell zur Chemosensibilisierung und Rückgang der Zellmotilität/Invasivität. In Gegenwart von DNp73 ist anzunehmen, dass es durch Suppression der p73-abhängigen miR-885-Expression zur Reinduktion von IGF-IR und zur Aktivierung des Signalwegs käme, welches die Aggressivität von Tumorzellen potenzieren würde. Bereits bekannte Mechanismen sind grau markiert. Die p73-abhängige miR-205-Expression führt über miR-205-gefördertes *Gensilencing* der anti-apoptotischen Moleküle E2F1, Bcl-2 und der ATP-bindenden Transporter ABCA2 und ABCA5 zu einer Chemosensibilisierung (Alla et al. 2012). In Gegenwart von DNp73 kommt es dagegen zur Aufhebung der p73-miR-205-Achse und folglich zur Ausbildung eines aggressiven und resistenten Phänotyps. Darüber hinaus fördert DNp73 die Aktivierung des IGF-IR-Signalwegs und induziert über die Inhibition von E-Cadherin die EMT (Steder et al. 2013).

Hinsichtlich der Entwicklung alternativer Therapiestrategien unter resistenten Bedingungen konnten Schipper et al. in metastasierten Melanomzellen zeigen, dass die transkriptionelle Aktivität von p73 durch spezifischen *Knock-down* der HDAC1



(Histon-Deacetylase 1) wiederhergestellt und durch gleichzeitige Überexpression des pro-apoptotischen Wildtyp-Proteins einer erhöhten Expression von DNp73 entgegengewirkt werden kann, sodass das Ansprechen auf Chemotherapeutika erhöht wird (Schipper et al., 2014). Darüber hinaus haben wir gezeigt, dass ein DNp73-Isoform-spezifischer *Knock-down* sowie die Überexpression von miR-205 als therapeutischer Ansatz zur Chemosensibilisierung führen kann (Vera et al., 2013). Aus der vorliegenden Arbeit geht hervor, dass die p73-vermittelte Induktion von miR-885 über die Hemmung des IGF-IR-Signalwegs zur Apoptoseinduktion und zum verbesserten zellulären Ansprechen auf Chemotherapeutika beitragen könnte.

## 5 Zusammenfassung

Die Tumorsuppressoren p53 und p73 sowie deren antagonistisch wirkenden Isoformen modifizieren Proliferation und Apoptose, indem sie verschiedene miR-Spezies induzieren oder supprimieren. Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, miR-885 als potentiellen Mediator von p73 zu charakterisieren und Signalwege aufzudecken, die durch miR-885 modifiziert werden.

miR-885 wurde kürzlich in einer *MicroArray*-Analyse als potentiell durch p73-regulierte miR identifiziert. In dieser Arbeit wurde dieser Befund zunächst validiert. Die ektope Expression von TAp73 in SK-Mel-29-, A549- und H1299-Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der miR-885-Expression. Umgekehrt resultierte die Depletion von p73 in der Suppression von miR-885. Die Chemotherapeutika Cisplatin und Doxorubicin induzierten *in vitro* sowohl die Expression von p73 als auch von miR-885. Hierbei macht die aufgetretene Repression der miR-885-Expression nach p73-*Knock-down* deutlich, dass die Aktivierung von miR-885 mit endogen induziertem p73 nach DNA-Schädigung in Verbindung steht. Außerdem konnte ein hemmender Effekt der onkogenen p73-Isoform DNp73 auf die Expression der miR-885 nachgewiesen werden, der wiederum nach ASO-vermittelter Inhibition von DNp73 konzentrationsabhängig aufgehoben wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zudem, dass DNp73 die p73-vermittelte Transaktivierung der miR-885 signifikant blockiert. Korrelationsstudien in Melanom- und Lungenkrebszelllinien ergaben eine direkte Assoziation zwischen endogen hohem DNp73-Anteil und erniedrigten miR-885-Leveln. Schließlich wurden potentielle Zielgene von miR-885 untersucht. Die Überexpression von miR-885 und auch von p73 führten zur Hemmung der IGF-IR-Expression und zur Dephosphorylierung der Signalkinasen AKT und ERK. Im Gegensatz dazu induzierte DNp73 die Expression von IGF-R und führte zur Aktivierung von AKT und ERK. Phänotypisch äußerte sich der inhibitorische Effekt von miR-885 auf die IGF-IR-Achse durch eine erhöhte Chemosensibilität maligner Tumorzellen sowie durch den Rückgang der Zellmigration und Invasivität. Ein anti-proliferativer Effekt von miR-885 konnte dagegen nicht nachgewiesen werden.

Damit wurde in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, dass p73 die Expression von miR-885 reguliert und miR-885 durch die negative Beeinflussung der IGF-IR-Expression und des IGF-IR-vermittelten Signalwegs tumorsupprimierende Eigenschaften besitzt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, Vandesompele J, Ehemann V, Theissen J, Fischer M, Zapatka M, Brors B, Savelyeva L, Sagulenko V, Speleman F, Schwab M and Westermann F. (2011).** MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death and Differentiation*, **18**, 974-984.
- Alla V, Kowtharapu BS, Engelmann D, Emmrich S, Schmitz U, Steder M and Pützer BM. (2012).** E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR-205 circuitry. *Cell Cycle*, **11**, 3067-3078.
- Alural B, Duran GA, Tufekci KU, Allmer J, Onkal Z, Tunalı D, Genc K and Genc S. (2014).** EPO Mediates Neurotrophic, Neuroprotective, Anti-Oxidant, and Anti-Apoptotic Effects via Downregulation of miR-451 and miR-885-5p in SH-SY5Y Neuron-Like Cells. *Frontiers in immunology*, **5**, 475.
- Bantel H and Simon HU. (2010).** DeltaNp73beta is oncogenic in hepatocellular carcinoma by blocking apoptosis signaling via death receptors and mitochondria. *Cell Cycle*, **9**, 2710-2711.
- Bartel DP. (2009).** MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, **136**, 215-233.
- Baserga R. (2005).** The insulin-like growth factor-I receptor as a target for cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets*, **9**, 753-768.
- Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB, MacDougald O A, Cho KR and Fearon ER. (2007).** p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology: CB*, **17**, 1298-1307.
- Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, Orntoft TF, Andersen CL and Dobbelsstein M. (2008).** p53-responsive micrnas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer research*, **68**, 10094-10104.
- Buhlmann S, Racek T, Schwarz A, Schaefer S and Pützer BM. (2008).** Molecular mechanism of p73-mediated regulation of hepatitis B virus core promoter/enhancer II: implications for hepatocarcinogenesis. *Journal of molecular biology*, **378**, 20-30.
- Candi E, Agostini M, Melino G and Bernassola F. (2014).** How the TP53 Family Proteins TP63 and TP73 Contribute to Tumorigenesis: Regulators and Effectors. *Human mutation*, **35**, 702-714.
- Chen DQ, Pan BZ, Huang JY, Zhang K, Cui SY, De W, Wang R and Chen LB. (2014).** HDAC 1/4-mediated silencing of microRNA-200b promotes chemoresistance in human lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget*, **5**, 3333-3349.
- Chen PS, Su JL and Hung MC. (2012).** Dysregulation of microRNAs in cancer. *Journal of biomedical science*, **19**, 1-8.
- Clemmons DR, Busby W, Clarke JB, Parker A, Duan C and Nam TJ. (1998).** Modifications of insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Endocrine journal*, **45 Suppl**, S1-8.
- Costanzo A, Pediconi N, Narcisi A, Guerrieri F, Belloni L, Fausti F, Botti E and Levrero M. (2014).** TP63 and TP73 in cancer, an unresolved "family" puzzle of complexity, redundancy and hierarchy. *FEBS letters*, **588**, 2590-2599.
- Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M and Hemmings BA. (1995).** Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, **378**, 785-789.
- Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, Gaur P, van Buren G2nd, Samuel S, Kim MP, Lim SJ and Ellis LM. (2009).** Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem

- cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer research*, **69**, 1951-1957.
- Davis BN and Hata A. (2009).** Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Communication and Signaling*, **7**, 1-22.
- Davis PK and Dowdy SF. (2001).** p73. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **33**, 935-939.
- Di C, Yang L, Zhang H, Ma X, Zhang X, Sun C, Li H, Xu S, An L, Li X and Bai Z. (2013).** Mechanisms, function and clinical applications of DNp73. *Cell Cycle*, **12**, 1861-1867.
- Di Leva G, Garofalo M and Croce CM. (2014).** MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, **9**, 287-314.
- Dong P, Karaayvaz M, Jia N, Kaneuchi M, Hamada J, Watari H, Sudo S, Ju J and Sakuragi N. (2013).** Mutant p53 gain-of-function induces epithelial-mesenchymal transition through modulation of the miR-130b-ZEB1 axis. *Oncogene*, **32**, 3286-3295.
- Dotsch V., Bernassola F., Coutandin D., Candi E. and Melino G. (2010).** p63 and p73, the ancestors of p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a004887.
- Emmrich S, Wang W, John K, Li W and Pützer BM. (2009).** Antisense gapmers selectively suppress individual oncogenic p73 splice isoforms and inhibit tumor growth in vivo. *Molecular cancer*, **8**, 61.
- Engelmann D and Putzer BM. (2014).** Emerging from the shade of p53 mutants: N-terminally truncated variants of the p53 family in EMT signaling and cancer progression. *Science signaling*, **7**, re9.
- Fang D, Hallman J, Sangha N, Kute TE, Hammarback JA, White WL and Setaluri V. (2001).** Expression of microtubule-associated protein 2 in benign and malignant melanocytes: implications for differentiation and progression of cutaneous melanoma. *The American journal of pathology*, **158**, 2107-2115.
- Fischer B, Marinov M and Arcaro A. (2007).** Targeting receptor tyrosine kinase signalling in small cell lung cancer (SCLC): what have we learned so far? *Cancer treatment reviews*, **33**, 391-406.
- Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S and Hofmann F. (2004).** In vivo antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer cell*, **5**, 231-239.
- Garrett TP, McKern NM, Lou M, Frenkel MJ, Bentley JD, Lovrecz GO, Elleman TC, Cosgrove LJ and Ward CW. (1998).** Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature*, **394**, 395-399.
- Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr., Levrero M and Wang JY. (1999).** The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature*, **399**, 806-809.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A and Enright AJ. (2006).** miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, **34**, D140-D144.
- Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schuller U, Denkhaus D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K and Pietsch T. (2005).** Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *The American journal of pathology*, **166**, 1153-1162.
- He L, He X, Lim LP, De Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D, Jackson AL, Linsley PS, Chen C, Lowe SW, Cleary MA and Hannon GJ. (2007).** A microRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Nature*, **447**, 1130-1135.
- Hermeking H. (2007).** p53 enters the microRNA world. *Cancer cell*, **12**, 414-418.

- Hermeking H. (2010).** The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ*, **17**, 193-199.
- Hsu HH, Cheng LH, Ho TJ, Kuo WW, Lin YM, Chen MC, Lee NH, Tsai FJ, Tsai KH and Huang CY. (2013).** Apicidin-resistant HA22T hepatocellular carcinoma cells massively promote pro-survival capability via IGF-IR/PI3K/Akt signaling pathway activation. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Huang Y, Chuang AY and Ratovitski EA. (2011).** Phospho-DeltaNp63alpha/miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. *Cell Cycle*, **10**, 3938-3947.
- Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC and Kaelin WG, Jr. (2003).** Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer cell*, **3**, 403-410.
- Jia CY, Li HH, Zhu XC, Dong YW, Fu D, Zhao QL, Wu W and Wu XZ. (2011).** MiR-223 suppresses cell proliferation by targeting IGF-1R. *PloS one*, **6**, e27008 (27001-27013).
- Jones M and Lal A. (2012).** MicroRNAs, wild-type and mutant p53: more questions than answers. *RNA biology*, **9**, 781-791.
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F and Caput D. (1997).** Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, **90**, 809-819.
- Knoll S, Emmrich S and Pützer BM. (2013).** The E2F1-miRNA cancer progression network. *Adv Exp Med Biol*, **774**, 135-147.
- Kusenda B, Mraz M, Mayer J and Pospisilova S. (2006).** MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia*, **150**, 205-215.
- Kvardova V, Hrstka R, Walerych D, Muller P, Matoulikova E, Hruskova V, Stelcova D, Sova P and Vojtesek B. (2010).** The new platinum (IV) derivative LA-12 shows stronger inhibitory effect on Hsp90 function compared to cisplatin. *Molecular cancer*, **9**, 147.
- Lacroix M and Leclercq G. (2004).** Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast cancer research and treatment*, **83**, 249-289.
- Lane DP and Crawford LV. (1979).** T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, **278**, 261-263.
- Lee HY, Chun KH, Liu B, Wiehle SA, Cristiano RJ, Hong WK, Cohen P and Kurie JM. (2002).** Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits the growth of non-small cell lung cancer. *Cancer research*, **62**, 3530-3537.
- LeRoith D. (2000).** Insulin-like growth factor I receptor signaling--overlapping or redundant pathways? *Endocrinology*, **141**, 1287-1288.
- Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, Tin VP, Cheng LC, Sihoe AD, Fink LM, Ma Y and Wong MP. (2010).** Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. *PloS one*, **5**, e14062.
- Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Sabatini S, Gong J, Wang JYJ and Melino G. (2000).** The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of Cell Science*, **113**, 1661-1670.
- Li B, Tsao SW, Chan KW, Ludwig DL, Novosyadlyy R, Li YY, He QY and Cheung AL. (2014).** Id1-induced IGF-II and its autocrine/endocrine promotion of esophageal cancer progression and chemoresistance--implications for IGF-II and IGF-IR-targeted therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, **20**, 2651-2662.
- Linzer DI and Levine AJ. (1979).** Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, **17**, 43-52.

- Lu C, Shao C, Cobos E, Singh KP and Gao W. (2012).** Chemotherapeutic sensitization of leptomycin B resistant lung cancer cells by pretreatment with doxorubicin. *PloS one*, **7**, e32895.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR and TR Golub. (2005).** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, **435**, 834-838.
- Lunghi P, Costanzo A, Mazzerà L, Rizzoli V, Levrero M and Bonati A. (2009).** The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clinical cancer research an official journal of the American Association for Cancer Research*, **15**, 6495-6502.
- Maas AM, Bretz AC, Mack E and Stiewe T. (2013).** Targeting p73 in cancer. *Cancer letters*, **332**, 229-236.
- Mantovani F, Piazza S, Gostissa M, Strano S, Zacchi P, Mantovani R, Blandino G and Del Sal G. (2004).** Pin1 links the activities of c-Abl and p300 in regulating p73 function. *Molecular cell*, **14**, 625-636.
- Masciarelli S, Fontemaggi G, Di Agostino S, Donzelli S, Carcarino E, Strano S and Blandino G. (2014).** Gain-of-function mutant p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of cultured tumor cells. *Oncogene*, **33**, 1601-1608.
- Massague J and Czech MP. (1982).** The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 5038-5045.
- Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, Farooqi AA, Lombardi A, Campani V, Zarone MR, Gulla A, Tagliaferri P, Tassone P and Caraglia M. (2014).** Mir-34: a new weapon against cancer? *Molecular therapy Nucleic acids*, **3**, e194.
- Murray-Zmijewski F, Lane DP and Bourdon JC. (2006).** p53/p63/p73 isoforms: an orchestra of isoforms to harmonise cell differentiation and response to stress. *Cell Death Differ*, **13**, 962-972.
- Nahor I, Abramovitch S, Engeland K and Werner H. (2005).** The p53-family members p63 and p73 inhibit insulin-like growth factor-I receptor gene expression in colon cancer cells. *Growth hormone & IGF research official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*, **15**, 388-396.
- Ory B and Ellisen LW. (2011).** A microRNA-dependent circuit controlling p63/p73 homeostasis: p53 family cross-talk meets therapeutic opportunity. *Oncotarget*, **2**, 259-264.
- Perks CM and Holly JM. (2003).** The insulin-like growth factor (IGF) family and breast cancer. *Breast disease*, **18**, 45-60.
- Phan TT, Lim IJ, Bay BH, Qi R, Longaker MT, Lee ST and Huynh H. (2003).** Role of IGF system of mitogens in the induction of fibroblast proliferation by keloid-derived keratinocytes in vitro. *American Journal of Physiology, of Cell Physiology*, **284**, C860-C869.
- Pozniak CD, Radinovic S, Yang A, McKeon F, Kaplan DR and Miller FD. (2000).** An anti-apoptotic role for the p53 family member, p73, during developmental neuron death. *Science (New York, NY)*, **289**, 304-306.
- Pützer BM, Stiewe T, Crespo F and Esche H. (2000).** Improved safety through tamoxifen-regulated induction of cytotoxic genes delivered by Ad vectors for cancer gene therapy. *Gene therapy*, **7**, 1317-1325.
- Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, Bentwich Z and Oren M. (2007).** Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Molecular cell*, **26**, 731-743.

- Rivlin N, Brosh R, Oren M and Rotter V. (2011).** Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*, **2**, 466-474.
- Rufini A, Agostini M, Grespi F, Tomasini R, Sayan BS, Niklison-Chirou MV, Conforti F, Velletri T, Mastino A, Mak TW, Melino G and Knight RA. (2011).** p73 in Cancer. *Genes & Cancer*, **2**, 491-502.
- Samani AA, Yakar S, LeRoith D and Brodt P. (2006).** The Role of the IGF System in Cancer Growth and Metastasis: Overview and Recent Insights. *Endocrine Reviews*, **28**, 20-47.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989).** Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 edn (New York USA).
- Schipper H, Alla V, Meier C, Nettelbeck DM, Herchenroder O and Putzer BM. (2014).** Eradication of metastatic melanoma through cooperative expression of RNA-based HDAC1 inhibitor and p73 by oncolytic adenovirus. *Oncotarget*, **5**, 5893-5907.
- Schlereth K, Charles JP, Bretz AC and Stiewe T. (2010).** Life or death: p53-induced apoptosis requires DNA binding cooperativity. *Cell Cycle*, **9**, 4068-4076.
- Seitz SJ, Schleithoff ES, Koch A, Schuster A, Teufel A, Staib F, Stremmel W, Melino G, Krammer PH, Schilling T and Muller M. (2010).** Chemotherapy-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma involves the p53 family and is mediated via the extrinsic and the intrinsic pathway. *International journal of cancer Journal international du cancer*, **126**, 2049-2066.
- Sekharam M, Zhao H, Sun M, Fang Q, Zhang Q, Yuan Z, Dan HC, Boulware D, Cheng JQ and Coppola D. (2003).** Insulin-like growth factor 1 receptor enhances invasion and induces resistance to apoptosis of colon cancer cells through the Akt/Bcl-x(L) pathway. *Cancer research*, **63**, 7708-7716.
- Siemens H, Jackstadt R, Kaller M and Hermeking H. (2013).** Repression of c-Kit by p53 is mediated by miR-34 and is associated with reduced chemoresistance, migration and stemness. *Oncotarget*, **4**, 1399-1415.
- Stanelle J, Tu-Rapp H and Pützer BM. (2005).** A novel mitochondrial protein DIP mediates E2F1-induced apoptosis independently of p53. *Cell Death Differ*, **12**, 347-357.
- Steder M, Alla V, Meier C, Spitschak A, Pahnke J, Furst K, Kowtharapu BS, Engelmann D, Petigk J, Egberts F, Schad-Trcka SG, Gross G, Nettelbeck DM, Niemetz A and Pützer BM. (2013).** DNp73 Exerts Function in Metastasis Initiation by Disconnecting the Inhibitory Role of EPLIN on IGF1R-AKT/STAT3 Signaling. *Cancer cell*, **24**, 512-527.
- Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf RC, Long J, Laidler P, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Stivala F, Mazzarino MC, Donia M, Fagone P, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Milella M, Tafuri A, Bonati A, Basecke J, Cocco L, Evangelisti C, Martelli AM, Montalto G, Cervello M and McCubrey JA. (2011).** Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging*, **3**, 192-222.
- Stiewe T, Theseling, CC and Putzer BM. (2002).** Transactivation-deficient Delta TA-p73 inhibits p53 by direct competition for DNA binding: implications for tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 14177-14185.
- Stiewe T and Pützer BM. (2002).** Role of p73 in malignancy: tumor suppressor or oncogene? *Cell Death and Differentiation*, **9**, 237-245.
- Suzuki HI, Yamagata K, Sugimoto K, Iwamoto T, Kato S and K Miyazono. (2009).** Modulation of microRNA processing by p53. *Nature*, **460**, 529-534.
- Tuve S, Wagner SN, Schitteck B and Pützer BM. (2004).** Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *International journal of cancer Journal international du cancer*, **108**, 162-166.

- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J and Fujita-Yamaguchi Y. (1986).** Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal*, **5**, 2503-2512.
- Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Nozoe T and Yasumoto K. (2006).** Expression of the p53 family in lung cancer. *Anticancer research*, **26**, 1785-1790.
- Vera J, Schmitz U, Lai X, Engelmann D, Khan FM, Wolkenhauer O and Putzer BM. (2013).** Kinetic modeling-based detection of genetic signatures that provide chemoresistance via the E2F1-p73/DNp73-miR-205 network. *Cancer research*, **73**, 3511-3524.
- Wightman B, Ha I and Ruvkun G. (1993).** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, **75**, 855-862.
- Wilson TR, Longley DB and Johnston PG. (2006).** Chemoresistance in solid tumours. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, **17 Suppl 10**, x315-324.
- Wolter KG, Verhaegen M, Fernandez Y, Nikolovska-Coleska Z, Riblett M, de la Vega CM, Wang S and Soengas MS. (2007).** Therapeutic window for melanoma treatment provided by selective effects of the proteasome on Bcl-2 proteins. *Cell Death Differ*, **14**, 1605-1616.
- Wong MY, Yu Y, Walsh WR and Yang JL. (2011).** microRNA-34 family and treatment of cancers with mutant or wild-type p53 (Review). *International journal of oncology*, **38**, 1189-1195.
- Yu H and Rohan T. (2000).** Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute*, **92**, 1472-1489.
- Zaika AI, Slade N, Erster SH, Sansome C, Joseph TW, Pearl M, Chalas E and Moll UM. (2002).** DeltaNp73, a dominant-negative inhibitor of wild-type p53 and TAp73, is up-regulated in human tumors. *The Journal of experimental medicine*, **196**, 765-780.
- Zhang D and Brodt P. (2003).** Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene*, **22**, 974-982.
- Zhang P, Gao WY, Turner S and Ducatman BS. (2003).** Gleevec (STI-571) inhibits lung cancer cell growth (A549) and potentiates the cisplatin effect in vitro. *Molecular cancer*, **2**, 1-9.
- Zhao X, Dou W, He L, Liang S, Tie J, Liu C, Li T, Lu Y, Mo P, Shi Y, Wu K, Nie Y and Fan D. (2013).** MicroRNA-7 functions as an anti-metastatic microRNA in gastric cancer by targeting insulin-like growth factor-1 receptor. *Oncogene*, **32**, 1363-1372.



## **7 Thesen**

### **These 1**

Die Identifizierung von p73-regulierten miRs spielt bei der Apoptose-Induktion durch p53/TAp73 in Krebszellen eine große Rolle.

### **These 2**

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war die Charakterisierung der miR-885 in verschiedenen Tumorzellen.

### **These 3**

Der Tumorsuppressor p73 induziert die Expression der miR-885.

### **These 4**

Eine Chemotherapeutika-Behandlung mit Cisplatin bzw. Doxorubicin führt zum Anstieg von p73 und miR-885.

### **These 5**

Die Repression der miR-885-Expression in Zytostatika-behandelten Tumorzellen nach Hemmung von p73 zeigt, dass die Regulation von miR-885 mit endogen induziertem p73 nach DNA-Schädigung in Verbindung steht.

### **These 6**

Ein inhibierender Effekt der onkogenen p73-Isoform DNp73 auf die p73-vermittelte Expression der miR-885 konnte dargestellt werden.

### **These 7**

Eine direkte Korrelation zwischen DNp73 und der miR-885 wurde in Melanom- und Lungenkrebszelllinien nachgewiesen.

### **These 8**

Sowohl ektopes p73 als auch die Überexpression der miR-885 führen zur Hemmung des IGF-I-Rezeptors und zur Inaktivierung der Signalkinasen AKT und ERK.

**These 9**

DNp73 induziert die Expression von IGF-IR sowie die Phosphorylierung von AKT und ERK.

**These 10**

Der inhibierende Effekt von miR-885 auf die IGF-IR-Achse äußert sich phänotypisch durch eine erhöhte Chemosensibilität sowie durch den Rückgang der Zellmigration und Invasivität.

**These 11**

miR-885 zeigt keinen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen.

**These 12**

In dieser Arbeit konnte eine tumorsupprimierende Funktion der miR-885 nachgewiesen werden.

## 8 Danksagung

In erster Linie möchte ich meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Pützer für die Möglichkeit der Anfertigung dieser interessanten und anspruchsvollen Arbeit in ihrem Institut danken. Ihre Offenheit und Bereitschaft, das Thema in sachlichen Diskussionen in unterschiedlichen Blickwinkeln zu beleuchten, haben mich sowohl gefordert als auch motiviert.

Mein Dank gilt außerdem Dr. Vijay Bhaskar Reddy Alla. Seine immerwährende Hilfe, Ruhe und Geduld als Betreuer sind mir während der Zeit im Labor eine große Unterstützung gewesen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Claudia Meier für ihre aufmerksame und kritische Korrektur. Sie hat mir auf dem langen Weg zur Zielgeraden neuen Input gegeben.

Ich möchte mich in besonderem Maße sehr herzlich bei Alf Spitschak, Anja Stoll, Deborah Goody, Susanne Knoll, Ingrid Winkler, Juliane Hartz und allen anderen Mitarbeitern des IEGT für ihre Hilfsbereitschaft sowie angenehme und entspannte Arbeitsatmosphäre bedanken. Ich werde diese Zeit immer in guter Erinnerung behalten und gerne an sie zurückdenken.

Zum Abschluss gilt der größte Dank meinen Freunden und vor allem meiner Familie, die stets an mich geglaubt und in jeder Stimmungslage bedingungslos unterstützt haben.

## 9 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Vorname: Sophie  
Nachname: Joost  
Geburtsdatum: 13.09.1988  
Geburtsort: Göttingen  
Familienstand: ledig. Ältere Tochter des Universitätsprofessors Hans-Georg Joost und der Kinderärztin Susanne Joost

### Werdegang:

#### **Bildungsweg**

1995-1999	Besuch der Grundschule GGS Gut Kullen in Aachen
1999-2002	Besuch des Gymnasiums St.Leonhard in Aachen, französisch bilingualer Zweig
2002-2008	Werner-von-Siemens Gymnasium in Berlin, Steglitz-Zehlendorf Leistungskurse: Französisch und Biologie
07/2008	Erfolgreiches Erreichen der Allgemeinen Hochschulreife

#### **Medizinische Ausbildung**

2008-2010	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Albert Szent-Györgyi Universität in Szeged, Ungarn
07/2010	Erfolgreiches Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
10/2010	Weiterführung des Klinischen Abschnitts des Studiums der Humanmedizin an der Universität Rostock

- |                 |   |
|-----------------|---|
| 10/2011-2015    | Dissertation im Institut für Experimentelle Gentherapie und Tumorforschung, Universitätsmedizin Rostock<br>Leitung: Univ.-Prof. Dr. med, Dr. rer. nat. Brigitte M. Pützer |
| 08-12/2013      | Absolvierung des 1. Tertials des Praktischen Jahres am Institut für Pathologie der Universität Rostock  |
| 12/2013-07/2014 | Absolvierung des 2. und 3. Tertials (Chirurgie, Innere Medizin) des Praktischen Jahres im Krankenhaus Bethel in Berlin, Steglitz-Zehlendorf                               |
| 11/2014         | Erfolgreiches Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung  |

## 10 Erklärungen

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Darüber hinaus versichere ich, dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen genutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Rostock, den 06 Februar 2015

---

Sophie Joost